

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

**Ciclo celular y fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer
: relevancia de estudios en células extraneuronales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Úrsula Muñoz Morón

DIRECTOR:

María Ángeles Martín-Requero

Madrid, 2015



CICLO CELULAR Y FISIOPATOLOGÍA DE LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. RELEVANCIA DE
ESTUDIOS EN CÉLULAS EXTRANEURONALES



635708359

Tesis presentada por **Úrsula Muñoz Morón** para optar al grado de Doctora por la
Universidad Complutense de Madrid

VºBº Directora de tesis

Dra. Ángeles Martín Requero

VºBº Tutor de tesis

Dr. José Castro Pérez

Doctoranda

Úrsula Muñoz Morón

La presente tesis ha sido realizada en el Departamento de Fisiopatología Celular y Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas, del C.S.I.C., con fondos aportados por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (01/1194) y PI04/0312 del Ministerio de Sanidad y Consumo y por el Ministerio de Educación y Ciencia (SAF 2003-01458). Parte de esta tesis ha sido publicada:

- **Muñoz U**, Cuevas N, Bartolomé F, Hermida O.G, Bermejo F y Martín-Requero A. "The cyclopentenone 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 inhibits G_1/S transition and retinoblastoma protein phosphorylation in immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease patients". *Exp. Neurol.* (2005) 195, 508-517
- **Muñoz U**, Bartolomé F, Bermejo F y Martín-Requero A. "Enhanced proteasome-dependent degradation of the CDK inhibitor $p27^{kip1}$ in immortalized lymphocytes from Alzheimer's dementia patients". *Neurobiol. Aging* (2007), doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.03.013. En prensa

Además, ha dado lugar a las siguientes comunicaciones en congresos nacionales, e internacionales:

- **Muñoz U**, Cuevas N, Hermida O.G. y Martín-Requero A. "The cyclopentenone 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 inhibits G_1/S transition and retinoblastoma protein phosphorylation in immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease patients"
9th International Conference on Alzheimer's Diseases and Related Disorders. Philadelphia, USA 2004.
- **Muñoz U**, Cuevas N, Bartolomé F y Martín-Requero A. "Enhanced proteasome-dependent degradation of the CDK inhibitor $p27^{kip1}$ in immortalized lymphocytes from Alzheimer's dementia patients"
30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference. Budapest, 2005
- **Muñoz U**, , Bartolomé F, Cuevas N y Martín-Requero A. "Alteración en la degradación de $p27^{kip1}$ en el proteasoma en linfocitos inmortalizados de pacientes de Alzheimer"
XXVIII Congreso de SEBBM. Zaragoza 2005
- Bartolomé F, Cuevas N, **Muñoz U** y Martín-Requero A. "Papel de Ca^{2+} /Calmodulina en el control de supervivencia/muerte celular en linfocitos inmortalizados de pacientes de Alzheimer"
XXVIII Congreso de SEBBM. Zaragoza 2005

- Martín-Requero A, Bartolomé F, **Muñoz U** y Bermejo F.
 “Ca²⁺/Calmodulin-mediated modulation of ERK1/2 activation regulates survival of lymphoblasts from patients with Alzheimer dementia”
 10th International Conference on Alzheimer’s Disease and Related Disorders. Madrid 2006
- **Muñoz U**, Bartolomé F, Sala S y Martín-Requero A.
 “Papel de la interacción entre las vías de señalización Ca²⁺/Calmodulina, PI3-K/Akt y ERK1/2 en el control de supervivencia/muerte celular en linfoblastos de pacientes de Alzheimer”
 XXIX Congreso de SEBBM, Elche 2006
- **Muñoz U**, Bartolomé F y Martín-Requero A.
 “PPAR γ -independent inhibition of PI3-K/Akt by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ increases p27^{kip} protein levels in immortalized lymphocytes from Alzheimer’s disease patients”
 III Meeting on the Molecular Mechanisms of Neurodegeneration, Milán 2007

A mis padres

Caminamos por sendas intrincadas y largos vericuetos hacia la evidencia.

Pedro Muñoz

Llegado el momento de escribir los agradecimientos de mi tesis no tengo ni idea de como expresar mi gratitud a tantas personas que han ayudado bien directamente o indirectamente a que este sueño se haya hecho realidad.

Sin más rodeos aunque con el propósito de no olvidar a nadie empiezo agradeciendo muy especialmente a la persona que me brindó la oportunidad de poder iniciar y concluir este trabajo en un ambiente de confianza y afecto, la Dra. Ángeles Martín Requero, a la que también quiero agradecer su generosidad a la hora de compartir su capacidad y su experiencia científica.

También quiero agradecer a las personas que han formado parte de mi laboratorio, la Dra. Ofelia García Hermida, por sus consejos y sus mimos, a Coti por todo lo que me has enseñado tanto dentro como fuera del laboratorio, por hacerme sentir parte de tu familia y hacer que nunca me encuentre sola, en definitiva por ser como eres. A Fernando, por tantos momentos compartidos en este laboratorio, porque a pesar de tus manías te quiero mogollón.

A los miembros del departamento de Fisiopatología Celular y Molecular, empezando por el Dr. Roberto Parrilla y la Dra. Matilde Sánchez Ayuso por su valía profesional y por impulsar los seminarios gracias a los cuales puedo luchar contra mi timidez, a la Dra. Consuelo González Manchón y el Dr. Ramón Rodríguez, por su ayuda tanto en lo profesional como en lo personal. Por último, dentro del departamento quisiera agradecer a Tomás los buenos momentos en la cafetería, a Elenita tener siempre una sonrisa y estar dispuesta a echarme una mano, a Nora por ser tan buena persona y generosa a la hora de ayudar y a Susana por su discreción y valía científica.

A los chicos del CIB: Raquelita, Afri, Eva, Laura, Rodri, Dina, Mariam, Adam, Darío, Simone, Oscar, Juan, Emilio y Jimena por tantos buenos momentos compartidos tanto dentro como fuera del centro, por crear una familia en el trabajo y en especial a Gaizka, Asier y Sonia porque os quiero.

A la gente que he conocido en Madrid y me han hecho sentir como si estuviera en casa: Javi, Sandra y Jesús, Carlos y Maria, Patri, Mónica, Alicia y mi querida amiga Amaia (que te voy a decir que no sepas.....)

A mis amigos de Huelva en especial a Mari (Carmen para los madrileños) por tantas cosas que hemos pasado juntas por haberme aguantado tantos años, porque

contigo he empezado y acabado las etapas más bonitas de mi vida, por amar a Huelva tanto como yo y ser casi como una hermana.

A mi amigo Rafa porque sabes que sin ti nunca hubiera llegado a este punto. GRACIAS por confiar en mí.

También quisiera agradecer la labor del Dr. Félix Bermejo, del Departamento de Neurología, del Hospital 12 de Octubre, de Madrid, la cuál ha sido fundamental para el desarrollo de esta tesis.

Gracias también al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Complutense de Madrid y en especial al Dr. José Castro Pérez, por haber aceptado la tutela de esta tesis.

A mis padres, por infinidad de cosas, por quererme, ayudarme, porque siempre estáis ahí para aguantar mis problemas, porque sois mi tesoro y lo más importante de mi vida. Porque nunca podré agradecerlos lo que habéis hecho por mí partiendo siempre de vuestro sacrificio, por todo esto y mucho más esta tesis es más vuestra que mía.

ÍNDICE

Abreviaturas	1
INTRODUCCIÓN	5
1. Definición e historia	6
2. Epidemiología, Etiología y Diagnóstico	9
3. Neurobiología y Neuropatología de la enfermedad de Alzheimer (EA)	13
3.1. Vulnerabilidad	13
3.2. Placas neuríticas	13
3.3. Ovillos neurofibrilares. Alteraciones en el citoesqueleto	15
4. Mecanismos moleculares implicados en la degeneración neuronal en la EA	17
4.1. β -amiloide	18
4.2. Hiperfosforilación de la proteína tau	22
4.3. Inflamación y EA	25
4.4. Estrés oxidativo y EA	28
4.5. Ciclo celular y EA	29
4.5.1. Alteraciones mitóticas en la EA	30
4.5.2. Reactivación del ciclo celular y muerte neuronal	33
4.5.3. Apoptosis neuronal	34
4.5.4. La entrada en ciclo es necesaria pero no suficiente para causar pérdida neuronal	35
4.5.5. Mecanismos de señalización implicados en la reactivación del ciclo celular en la EA	37
5. Utilización de células extraneuronales en el estudio de la patogénesis de EA	41
OBJETIVOS DE LA TESIS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	47
MATERIALES Y MÉTODOS	51
1. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica y establecimiento de líneas celulares linfoblásticas	52
1.1. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica	52
1.2. Aislamiento de linfocitos B	53
1.3. Establecimiento de líneas celulares linfoblásticas	54
1.3.1. Producción del virus Epstein-Barr	55
1.3.2. Transformación de linfocitos	55

2.	Métodos analíticos	56
2.1.	Determinación de intermediarios	56
2.1.1.	Determinación de glucosa	56
2.1.2.	Determinación de lactato	57
2.2.	Análisis del ciclo celular	57
2.3.	Determinación de la proliferación celular	58
2.4.	Determinación de la apoptosis celular	59
2.4.1.	Incorporación de Ioduro de Propidio	59
2.4.2.	Inclusión/exposición de Ioduro de Propidio y fosfatidilserina	59
2.5.	Inmunodetección y EMSA	59
2.5.1.	Preparación de extractos celulares y nucleares	59
2.5.2.	Western Blotting	60
2.5.3.	Inmunoprecipitación y ensayo de la actividad quinasa del complejo ciclina E/CDK2	62
2.5.4.	Inmunolocalización de p27	62
2.5.5.	Ensayos de movilidad electroforética (EMSA)	63
2.6.	Determinación de la actividad del proteasoma	64
3.	Análisis estadístico	64
	RESULTADOS	65
1.	Establecimiento de las líneas linfoblásticas	66
1.1.	Descripción de los individuos donantes de sangre	66
2.	Actividad proliferativa de linfoblastos de donantes controles y pacientes con EA	71
2.1.	Efecto del suero sobre la proliferación celular	71
2.2.	Estudio de la vías de señalización celular implicadas en la respuesta proliferativa al suero	72
2.3.	Actividad proliferativa y metabólica de linfoblastos de individuos controles y pacientes con EA	75
2.4.	Actividad proliferativa de linfoblastos de individuos control y pacientes con DCLw	77
2.5.	Expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular	77

2.6.	Estado del ciclo celular y niveles de p27 en CMSP y linfocitos B de individuos controles y pacientes con EA.	79
3.	Regulación del contenido celular de p27	81
3.1.	Determinación de la vida media de p27 en linfoblastos controles y de EA	81
3.2.	Papel de la vía ubiquitin-proteasoma en la degradación de p27 en linfocitos inmortalizados	83
3.2.1.	Actividad del proteasoma en linfoblastos controles y de EA	85
3.2.2.	Relación entre fosforilación de p27 en Thr187 y niveles de p27 en linfoblastos donantes controles y de EA	86
3.3.	Localización celular de p27 en linfoblastos donantes controles y de EA	88
3.4.	Estudio de las principales vías implicadas en el control de la fosforilación de p27	89
3.4.1.	Implicación de PI3-K en el control de la degradación de p27	90
3.5.	Papel de Ca^{2+} /CaM en el control de la degradación de p27 mediada por PI3-K/Akt	92
3.6.	Efecto de los inhibidores de CaM quinasa y calcineurina en la fosforilación de Akt y contenido celular de p27	95
4.	Papel de la activación de PPAR γ en la respuesta proliferativa de linfoblastos controles y de EA	96
4.1.	Expresión y activación de PPAR γ	96
4.2.	Efecto de 15d-PGJ ₂ sobre proliferación celular. Dosis respuesta	98
4.2.1.	Efecto de la 15d-PGJ ₂ sobre el ciclo celular	104
4.2.2.	Efectos de la 15d-PGJ ₂ en la expresión y el estado de fosforilación de proteínas reguladoras del ciclo celular	106
4.3.	Regulación de los niveles de p27 por 15d-PGJ ₂	108
4.3.1.	Efecto de la 15d-PGJ ₂ sobre la actividad del proteasoma	109
4.4.	Efecto de la 15d-PGJ ₂ sobre la actividad PI3-K/Akt	112
4.5.	Efecto de la 9,10 dihidro-15d-PGJ ₂ sobre proliferación celular, niveles de p27 y sobre la actividad PI3-K/Akt	114

DISCUSIÓN	117
1. Caracterización de las líneas linfoblásticas con EA	118
2. Alteración en la actividad proliferativa de linfoblastos de pacientes con EA	120
3. Papel de la vía de señalización Ca^{2+} /CaM en el control de proliferación de linfoblastos de individuos controles y de EA	125
4. Papel de PPAR γ en el control de proliferación de linfoblastos de individuos controles y de EA	130
CONCLUSIONES	137
BIBLIOGRAFÍA	140

ABREVIATURAS

15d-PGJ₂: 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂

A β : β -amiloide

AACT: α -1 antiquimiotripsina

ACE: acetil colinesterasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADRDA: del inglés *Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (Asociación de Alzheimer y Enfermedades Relacionadas).

AINEs: antiinflamatorios no esteroideos

A2M: α -2 macro globulina

APO E: apolipoproteína E

APP: del inglés *Amyloid Precursor Protein of Alzheimer's disease* (Proteína Precursora de Amiloide)

APP-BP1: del inglés *Amyloid beta Precursor Protein Binding Protein 1*. (Proteína 1 de unión a APP).

ARN: ácido ribonucleico

ATP: adenosín trifosfato

BACE: enzima β -secretasa

BCHE: del inglés *Butyrylcholinesterase*. (Butirilcolinesterasa)

CaM: calmodulina

CaMKII: calmodulina quinasa II

CaM KK: calmodulina quinasa quinasa

CDKs: del inglés *Cyclin-Dependent Kinases* (Quinasa Dependiente de Ciclina)

CDKI: del inglés *Cyclin-Dependent Kinases Inhibitor* (Inhibidor de Quinasa Dependiente de Ciclina)

CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica

CMZ: calmidazolium

COX: ciclooxigenasa

DABCO: 4 diazabicyclo (2,2,2) octano

Dapi: 4',6-Diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro

DFT: Demencia Frontotemporal

DMSO: dimetilsulfóxido

DTT: ditiotritol

DCL: deterioro cognitivo leve

EA: Enfermedad de Alzheimer

EAF: Enfermedad de Alzheimer Familiar

EBV: Epstein-Barr Virus

ECL: del inglés *Enhanced chemiluminiscent*

EDTA: ácido etilen diamino tetracético

EEG: Electroencefalograma

EGTA: ácido etilenglicol tetracético

ELA: Esclerosis Lateral Amiotropica.

EMSA: del inglés *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (Ensayo de Movilidad Electroforética)

FBS: del inglés *Fetal Bovine Serum* (Suero Fetal Bovino)

FHA: Filamentos Helicoidales Apareados

FISH: del inglés *Fluorescence In Situ Hybridation* (Fluorescencia de Hibridación In Situ)

G₁ (fase): gap 1

G₂ (fase): gap 2

GNDC: Grupo de Neurología de la Conducta y de Demencias

h: horas

H7: 1-(5-isoquinolinilsulfonil)-2-metilpiperacina

Hepes: N-[2-hidroxietil] piperacina-N'-[2-ácido etanosulfónico]

hKIS: del inglés *human Kinase Interactin Stahmin*

IDE: del inglés *Insulin Degrading Enzyme* (Enzima Degradante de Insulina)

IL-1a: interleuquina 1A

IL-1b: interleuquina 1B

IP: Ioduro de Propidio

KCl: cloruro potásico

KClO₄: perclorato de potasio

KH₂PO₄: Fosfato diácido de potasio

KN-62: 1-(N-O-bis [5-isoquinolinesulfonil]-N-metil-L-tirosil)- 4-fenilpiperacina)

KOH: hidróxido de potasio

LCR: líquido cefalorraquídeo

MgCl₂: cloruro magnésico

M-CSF: del inglés *Macrophage Colony Stimulating Factor* (Factor Estimulante de Macrófagos)

MHC: del inglés *Major Histocompatibility Complex* (Complejo Mayor de Histocompatibilidad)

MAP: del inglés *Microtubule Associated Protein* (Proteína Asociada a Microtúbulos)

MAPK: del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases* (Quinasas Activadas por Mitógenos)

min: minutos

MMS: del inglés *Mini Mental Status* (Test Mini Mental)

MTT: bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolium

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NaCl: cloruro sódico

NaF: fluoruro sódico

Na₂HPO₄: fosfato ácido de sodio

NINCDS: del inglés *National Institute of Neurological and Communication Disorders and Stroke* (Instituto Americano de Enfermedades Neurológicas, Cognitivas e Infarto)

NF-κB: del inglés *Nuclear Factor κB*

NP-40: Nonidet P-40

PAK3: del inglés *p21-activated kinase 3* (quinasa 3, activada por p21)

PI3-K: del inglés *phosphatidylinositol 3 kinase*

PET: del inglés *positron emission tomographs* (Tomografía por Emisión de Positrones)

PFA: paraformaldehído

PBS: del inglés *phosphate buffered saline* (Tampón Fosfato Salino)

PHF: del inglés *Paired Helical Filaments* (Pares de Filamentos Helicoidales)

PLAU: del inglés *plasminogen activator urokinase* (Activador de Plasminógeno, Uroquinasa)

PM: peso molecular

PMSF: fluoruro fenilmetilsulfonil

PPAR γ : del inglés *peroxisome proliferator activated receptors*

pRb: proteína de retinoblastoma

PS: presenilina

PS: fosfatidil serina

PTX: del inglés *Pertussis Toxin* (Toxina Pertussis)

PVDF: del inglés *PolyVinylidene Fluoride* (poli fluoruro de vinilidene)

PWM: del inglés *Pokeweed Mitogen* (Mitógeno Pokeweed)

Rb: retinoblastoma

ROS: del inglés *Reactive Oxygen Species* (Especies Reactivas de Oxígeno)

SAPK: del inglés *Stress-Activated Protein Kinase* (Quinasas Activadas por Estrés)

S (fase): fase de síntesis de ADN

SLN: Señal de Localización Nuclear

SNC: Sistema Nervioso Central

SPECT: del inglés *Single-Photon Emission Computed Tomography* (Tomografía por Emisión de Fotón Único).

TAC: Tomografía Axial Computerizada.

TBS: del inglés *Tris-HCl buffered saline* (Tampón Salino Tris-HCl)

Tg: transgénico

VLDLR: del inglés *Very Low Density Lipoprotein Receptor* (Receptor de Lipoproteína de Muy Baja Densidad)

W12: N-(4-aminobutil)-2- naftalensulfonamida

W13: N-(4-aminobutil)-5- cloro-2-naftalenesulfonamida

W7: N-(6-aminoheptil)-5- cloro-1-naftalensulfonamida

INTRODUCCIÓN

1. Definición e historia

Clínicamente, la enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo de tipo progresivo que conduce a un deterioro global de las funciones cognitivas. Los individuos afectados tienen problemas de memoria, de lenguaje, incapacidad para resolver problemas y de razonar; en algunos casos tienen síntomas psicóticos como paranoia y alucinaciones. La enfermedad suele tener una duración media aproximada de diez años, aunque puede variar mucho de un paciente a otro.

A pesar de que el primer caso de esta enfermedad fue descrito por Alois Alzheimer en 1907, ha sido en las últimas tres décadas cuando se ha reconocido la magnitud de la enfermedad y se han producido grandes avances en el conocimiento de la etiología de la EA. La Figura 1 representa un esquema de la cronología de los principales descubrimientos en el estudio de la patología de EA.

La evaluación médica y descripción original de A. Alzheimer hacía referencia a la presencia de ovillos neurofibrilares y placas neuríticas en el cerebro de una mujer de 53 años, fallecida tras una corta enfermedad, cuyos principales síntomas fueron demencia, trastornos de lenguaje, alteraciones de memoria y celopatía.

Originalmente, se consideró a la enfermedad como un tipo raro de demencia pre-senil y no fue hasta finales de los años sesenta cuando se demostró, de forma inequívoca, la presencia de ovillos neurofibrilares y placas neuríticas en ancianos con deterioro cognitivo, genéricamente diagnosticados de demencia senil (Blessed y cols., 1968). De esta forma, la enfermedad de Alzheimer pasó de ser considerada una rareza, a ser reconocida como la principal causa de demencia en los ancianos y uno de los principales problemas de salud de nuestro tiempo. Paralelamente, se empezaron a desarrollar criterios estrictos para su diagnóstico clínico (McKhann y cols., 1984).

Una vez que la enfermedad pudo ser estudiada ultraestructuralmente mediante el microscopio electrónico, Kidd y Terry dieron a conocer la ultraestructura de las placas neuríticas y de los ovillos neurofibrilares (Kidd, 1963; Terry, 1963). Ambos investigadores describieron los filamentos helicoidales apareados (FHA) de los ovillos neurofibrilares y Terry, además, observó que el núcleo de las placas neuríticas estaba constituido por material fibrilar amiloide (Terry, 1978). Posteriormente a los descubrimientos de Kidd y Terry, la biología molecular permitió conocer que los ovillos neurofibrilares estaban constituidos por proteína Tau hiperfosforilada y que el núcleo de las placas neuríticas estaba formado por un péptido, β -amiloide, de 40-42 aminoácidos (Glenner y Wong, 1984; Goedert y cols., 1991).

Un hallazgo importante desde el punto de vista terapéutico fue el descubrimiento por David Bowen de la existencia de un déficit colinérgico en la EA (White y cols., 1977), pues abrió una vía para el tratamiento con análogos de acetilcolina e inhibidores del enzima acetilcolinesterasa, siendo el primer gran paso que se ha dado en el tratamiento de la enfermedad. Los avances en el campo de la genética molecular y la generación de animales transgénicos como modelo experimental para el estudio de la enfermedad han contribuido a un mayor entendimiento de la EA. Sin embargo, aún quedan importantes cuestiones que resolver y una enorme presión social sobre la necesidad de desarrollar métodos eficaces de diagnóstico precoz y tratamientos que no sean únicamente paliativos. En este sentido, es interesante reseñar el estudio de Brookmeyer y cols., en 1998, que estimaron que podría reducirse en un 50% el número de pacientes con EA en el año 2050, si se consiguiera retrasar la aparición de la enfermedad en sólo 5 años.

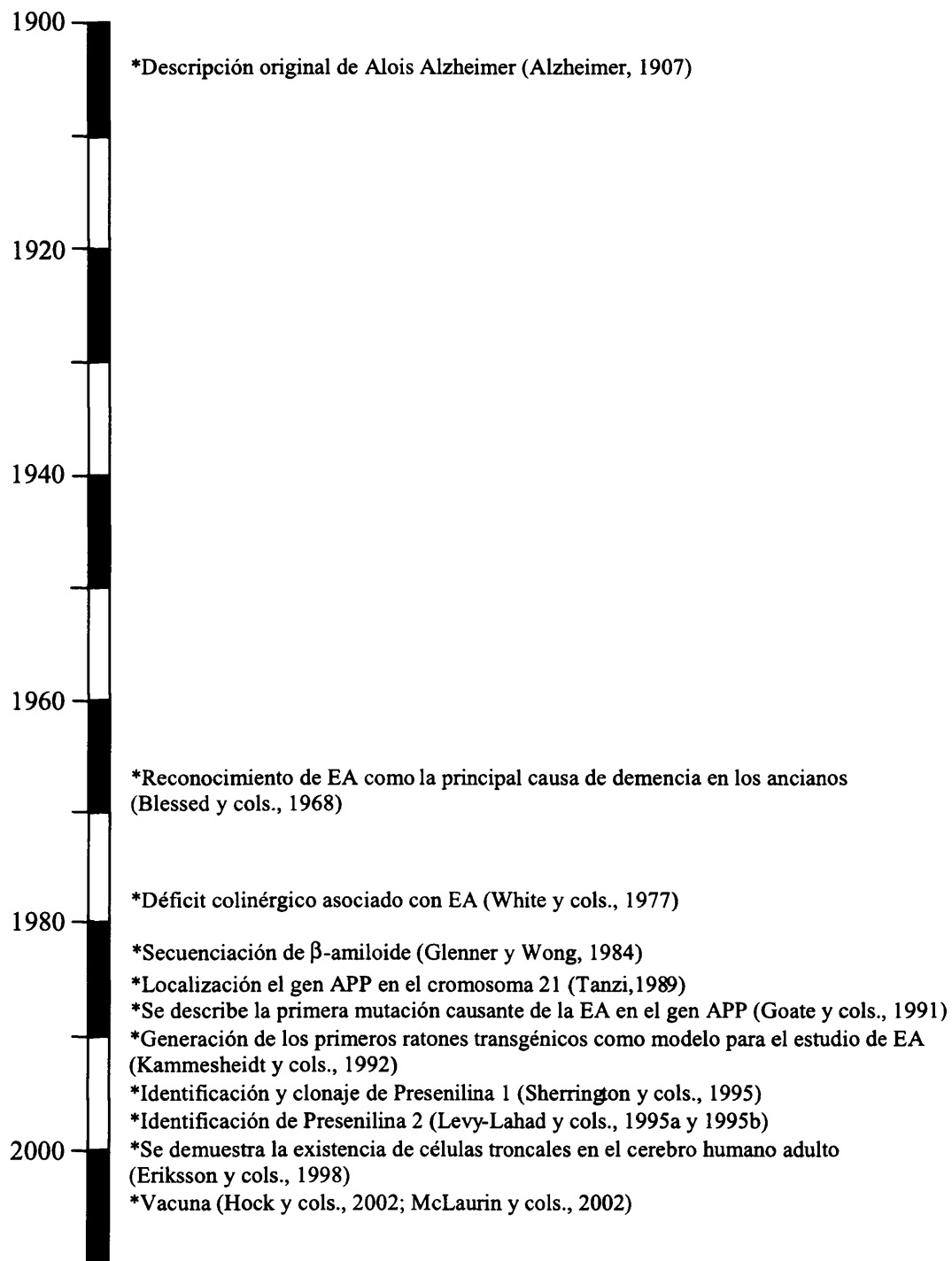


Figura 1.- Cronología de hallazgos relevantes para el conocimiento de la EA.

2. Epidemiología, Etiología y Diagnóstico

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia en individuos de mediana y avanzada edad. Afecta al 7-10% de los individuos mayores de 65 años y, aproximadamente, al 40% de los que han superado los 80 años de edad. El número de personas afectadas por la enfermedad en los países avanzados aumenta progresivamente debido al incremento significativo en las expectativas de vida. Se calcula que existen ya en el mundo 18 millones de personas que sufren de demencia, de las cuales cerca de dos tercios; es decir, aproximadamente 12 millones están afectados por la EA. Los pronósticos para el año 2025 indican que se habrá doblado el número de personas con demencia respecto al año 1980 en los países desarrollados, mientras que el número se multiplicará por cuatro en los países del Tercer Mundo. En nuestro país la enfermedad afecta aproximadamente a 400.000 personas y las expectativas son que esta cifra se doblará en el año 2020. Constituye ya la décima causa de mortalidad en España. Por estas razones, la enfermedad de Alzheimer ha sido nombrada como la epidemia silenciosa del siglo XX.

La etiopatogenia de la enfermedad es múltiple. Se clasifica en dos tipos:

- Enfermedad de aparición precoz o EA presenil, cuando los síntomas se manifiestan antes de los 65 años. También conocida como enfermedad de Alzheimer de tipo genético o familiar, representa entre el 1% y el 5% de los casos.
- Enfermedad de aparición tardía, si se manifiesta después de los 65 años de edad. También conocida como enfermedad de Alzheimer compleja o esporádica, representa el resto de los casos.

La EA de tipo familiar se genera por la transmisión autosómica dominante de alteraciones en los cromosomas 1 (presenilina 2, PS2), 14 (presenilina 1, PS1) o 21 (Proteína Precursora de Amiloide, APP) (ver tabla I). Hasta el momento se han identificado tres mutaciones en PS2 (Hardy, 1997), numerosas mutaciones en PS1 y nueve mutaciones en el gen que codifica para la APP en algunos centenares de familias en el mundo. Las mutaciones en PS1 originan una forma más agresiva que las mutaciones en PS2, en la que los síntomas aparecen antes de los 50 años y causa la muerte aproximadamente a los 60 años de edad. La frecuencia de aparición de mutaciones en PS1 y PS2 es de 2-3% y 0,5% del total de casos de EA de aparición precoz, respectivamente (Richard y Amouyel, 2001). Las mutaciones en APP afectan a muy pocas familias en el mundo entero y se ha estimado que sólo dan cuenta del 0,4% de los casos de EA (Richard y Amouyel, 2001), pero su aparición tiene severas consecuencias biológicas. La edad de aparición de la enfermedad en estas familias oscila entre 39 y 67 años y la penetrancia es del 100% en los portadores.

En la EA de tipo esporádico, la etiología es multifactorial con diversos factores de riesgo que incluyen la predisposición genética; así por ejemplo, se sabe que la EA es más frecuente en los sujetos portadores del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E (APOE, cromosoma 19), especialmente en los casos homocigóticos para dicho alelo (Ver tabla I). Por el contrario, se ha postulado un efecto opuesto para el alelo $\epsilon 2$ de la misma APOE, que tendría por tanto un papel protector. Cada vez es más abrumadora la evidencia epidemiológica de que los factores de riesgo exógenos y ambientales como la diabetes, hipertensión arterial, dietas ricas en grasas, tabaquismo..., y otros como la intoxicación crónica leve por metales como el cobre, favorecen también el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en las personas genéticamente predispuestas. Sin embargo, ni los factores genéticos ni los ambientales, por separado, provocan la enfermedad. Los factores genéticos y ambientales son necesarios, pero no suficientes, necesitando además del factor envejecimiento. Así por ejemplo, la prevalencia aumenta con la edad pasando de ser de un 0,02% en el tramo de edad de los 30 a los 59 años, a un 10,8% para el tramo comprendido entre los 80 y los 89 años.

Tabla I.- Factores genéticos en la enfermedad de Alzheimer.

MUTACIONES (Asociadas con EAF)	POLIMORFISMO (Asociados con casos esporádicos)	
	CONFIRMADOS	NO CONFIRMADOS
<p>-Gen de la APP (Cromosoma 21).</p> <p>-Gen de la PSEN1 (Cromosoma 14) (Sherrington y cols., 1995)</p> <p>-Gen de la PSEN2 (Cromosoma 1) (Levi-Lahad y cols., 1995a y 1995b)</p>	<p>-Alelo $\epsilon 4$ del gen de la APOE (Cromosoma 19) (Bullido y cols., 1998)</p>	<p>-Gen A2M (Cromosoma 12) (Pericak-Vance y cols., 1997)</p> <p>-Gen VLDLR (Cromosoma 9) (Okuizumi y cols., 1995)</p> <p>-Gen AACT (Cromosoma 14) (Finckh, 2003)</p> <p>-Gen BCHE (Cromosoma 3) (Alvarez-Arcaya, 2000)</p> <p>-Gen ACE (Cromosoma 17) (Richard y cols., 2000)</p> <p>-Genes IL-1a y IL-1b. (Cromosoma 2) (Nicoll y cols., 2000; Grimaldi y cols., 2000).</p> <p>-Gen PLAU (Cromosoma 10) (Reiemenschneider y cols., 2006)</p> <p>-Otros, hasta unos setenta genes. (http://www.alzgene.org)</p>

A2M: α -2 macro globulina, VLDLR: receptor de lipoproteínas de muy baja densidad, AACT: α -1 antitripsina, BCHE: butirilcolinesterasa K, ACE: acetil colina, IL-1a y IL-1b: interleuquinas 1A y 1B, PLAU: Activador de plasminógeno, uroquinasa.

Muchos de esos factores son controlables mediante la dieta, el mantenimiento de un peso corporal adecuado y algunos medicamentos, lo que incrementa su importancia epidemiológica. Lo mismo puede decirse de la llamada "Reserva Cognitiva", que se define como un modelo dinámico de activación cerebral que utilizan los sujetos normales y que implica una capacidad para la activación progresiva de redes neuronales en respuesta al aumento en las demandas cognitivas (Stern, 2006). Los sujetos con mayor capacidad cognitiva natural y adquirida (cociente intelectual, cultura, estudios académicos, participación en actividades intelectuales y de esparcimiento como juegos de mesa, baile...) presentan la enfermedad más tarde que los sujetos con menor Reserva Cognitiva; a igual cantidad de lesiones histopatológicas cerebrales típicas de enfermedad de Alzheimer presentes en sus cerebros. Aparentemente, las personas con mayor reserva cognitiva compensan las lesiones histopatológicas utilizando redes cerebrales alternativas, y esto, les permite funcionar con más normalidad que la que cabría esperar del análisis histopatológico.

La heterogeneidad de la EA y la necesidad de refinar su diagnóstico hizo que, en 1984, un grupo de expertos del Instituto Americano de enfermedades neurológicas, cognitivas e infarto (NINCDS) y la asociación de Alzheimer y enfermedades relacionadas (ADRDA), estableciesen unos parámetros de diagnóstico de esta enfermedad que fuesen utilizados de forma sistemática por todos los profesionales (McKhann y cols., 1984). De esta manera, unificando los criterios, sería posible una mejor evaluación de los ensayos clínicos o la validación de pruebas de laboratorio, así como el establecimiento de correlaciones clínico patológicas. Además del diagnóstico neuropsicológico de demencia, se evalúan en cada caso tomografías computarizadas, imagen y/o espectroscopia de resonancia magnética, tomografía de emisión de positrones, electroencefalograma y otros análisis que permiten; además, eliminar otras posibles causas patológicas para el deterioro mental como accidentes cerebrovasculares, infecciones, traumatismos, etc. Aun así, el diagnóstico se considera sólo probable o posible a menos que haya una confirmación post-mortem a través del análisis de la anatomía patológica del cerebro del enfermo.

En la actualidad, se considera importante poder detectar, de forma fiable, lo que se ha dado en llamar deterioro cognitivo leve (DCL), y poderlo diferenciar del concepto de "demencia". EL DCL se caracteriza por una alteración adquirida y prolongada de una o

varias funciones cognitivas y que no cumple criterios suficientes de gravedad para ser calificado de demencia. Se estima que el 55% de los casos desemboca en EA en un plazo de 4,5 años (Ávila y cols., 2004). La conveniencia de identificar casos de DCL (EA incipiente) frente a los casos de DCL de otra etiología, llevó al grupo de Neurología de la Conducta y Demencias (GNDC) de la Sociedad Española de Neurología a encargar a un grupo de expertos la redacción de criterios más precisos que han sido publicados recientemente (Robles y cols., 2002) y que incluyen pruebas opcionales, como análisis genéticos y de algunos marcadores biológicos, así como las técnicas de neuroimagen estructural y funcional.

3. Neurobiología y Neuropatología de la EA

3.1. Vulnerabilidad

La EA afecta de forma selectiva a ciertas regiones del cerebro, principalmente a las áreas de asociación cortical y del sistema límbico, mientras que otras permanecen relativamente preservadas. La pérdida neuronal afecta fundamentalmente a las grandes neuronas corticales (Mann y cols., 1988), hipocampo, amígdala y corteza entorrinal. Histopatológicamente la enfermedad se caracteriza por la formación de placas neuríticas o seniles, ovillos neurofibrilares en el citoplasma de las neuronas y depósitos amiloides en el endotelio vascular de la corteza cerebral. Estas lesiones estructurales aparecen principalmente en las zonas límbicas y en la corteza de asociación heteromodal, existiendo una menor densidad de lesiones en las zonas sensoriales primarias, áreas motoras, ganglios basales y cerebelo (DeKosky, 2002). Por otra parte, también se observa una cierta vulnerabilidad selectiva de los sistemas neurotransmisores. El sistema colinérgico es el más afectado, aunque también depende de la zona cerebral, como es el caso de la pérdida de neuronas colinérgicas en la región anterior basal, pero no en el tallo cerebral (Davies y Maloney, 1976).

3.2. Placas neuríticas

Las placas neuríticas, una de las dos lesiones cerebrales descritas en el artículo original de Alzheimer, son acúmulos microscópicos extracelulares de diámetro variable (entre 20 y 200 μm) que se asocian al daño de axones y dendritas en ciertas áreas del

cerebro como el área de asociación de la corteza, hipocampo y amígdala (Morris y cols., 1996, McKhann y cols., 1984) (figura 2).

Se componen de un núcleo central de amiloide fibrilar, visible con la tinción de tioflavina o rojo Congo, rodeado de neuritas distróficas, que contienen restos de lisosomas y mitocondrias, y de astrocitos y microglía. Las neuritas distróficas que forman parte de cada placa pueden derivar de los distintos tipos de neuronas, colinérgicas, dopaminérgicas, etc. El tiempo de generación de estas placas se desconoce, pero es probable que se desarrollen de forma gradual en un margen de tiempo considerable, muchos meses o años (Selkoe, 2001a).

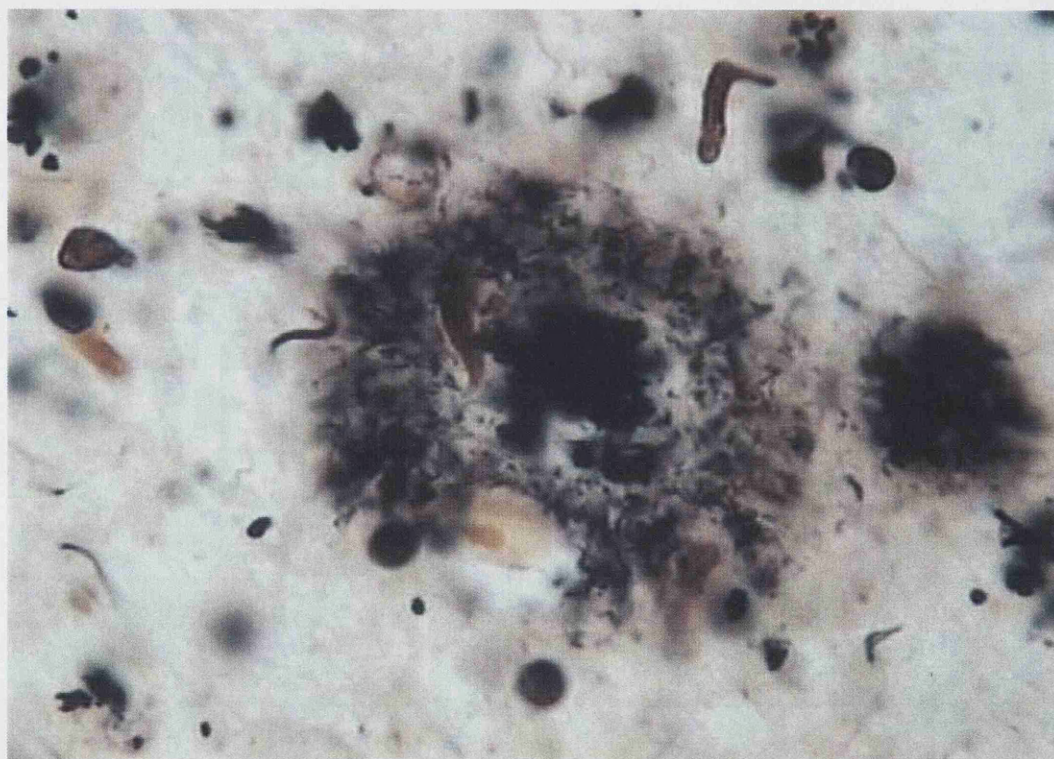


Figura 2.- Placas neuríticas con centro amiloide y neuritas distróficas periféricas

Tinción de plata en córtex cerebral (x 100)

La mayor parte del β -amiloide fibrilar presente en las placas neuríticas es el fragmento A β de 42 residuos, que es la forma más hidrofóbica y susceptible de formar agregados (Jarrett y cols., 1993), aunque también contiene A β 40 (Iwatsubo y cols., 1994). Estos péptidos son producto de la hidrólisis de la llamada proteína precursora de amiloide, APP, una proteína estructural de membrana que se expresa de forma ubicua

(Selkoe y cols., 1988). La función de esta proteína no se sabe por completo. El análisis de su estructura primaria sugiere que APP puede ser un receptor de superficie glicosilado (Kang y cols., 1987). El análisis de la expresión de APP durante el desarrollo del cerebro, sugiere que esta proteína es importante para la maduración del sistema nervioso central ya que parece estar involucrada en la formación y en el mantenimiento de conexiones sinápticas y plasticidad neuronal (Kirazov y cols 2001). Además, la APP juega un papel importante en la respuesta al estrés y en la regulación de daños en el sistema nervioso (Panegyres, 2001).

Cuando se dispuso de anticuerpos específicos contra β -amiloide endógeno o sintético, se pudieron observar depósitos de β -amiloide sin la apariencia fibrilar característica de las placas neuríticas y con una distribución cerebral más amplia. Estas formaciones se denominan placas difusas y sólo contienen $A\beta_{42}$. Aparentemente, estas placas difusas son lesiones prematuras, que eventualmente pueden evolucionar hacia la formación de las clásicas placas neuríticas como lo sugieren las observaciones realizadas en ratones transgénicos que expresan mutantes de la APP humana (Selkoe, 2001b), así como en estudios inmunohistoquímicos de pacientes con síndrome de Down (Lemere y cols., 1996). Estos enfermos presentan, frecuentemente, placas difusas en la adolescencia, pero no las clásicas placas neuríticas, que aparecen por lo general dos décadas después.

3.3. Ovillos neurofibrilares. Alteraciones en el citoesqueleto

La mayoría de neuronas afectadas en la EA, presentan entramados u ovillos neurofibrilares, muy poco solubles, que son acúmulos de filamentos proteicos lineales de aproximadamente 10 nm y pares de filamentos que se enrollan formando hélices con una periodicidad media de 160 nm (Selkoe 2001a) (figura 3). Estos entramados son fácilmente distinguibles de otras estructuras filamentosas normales, como los neurofilamentos o microtúbulos. La localización habitual de estos ovillos es siempre intracelular pero, ocasionalmente, se encuentran en el parénquima, liberados por la célula como resultado de la muerte neuronal. Los entramados neurofibrilares también se encuentran en otras enfermedades como el síndrome de Down, la demencia pugilística y el parkinsonismo post-encefálico. Las técnicas de química de proteínas permitieron determinar que

la proteína Tau era el componente mayoritario de los filamentos helicoidales emparejados (PHF) (Wischik y cols., 1988), que dan lugar a los ovillos neurofibrilares y se encuentran principalmente en el hipocampo, córtex entorrinal y amígdala. Los PHF son estructuras anómalas generadas por la agregación e hiperfosforilación de Tau (Julien y Mushynski, 1998; Buée y cols., 2000).

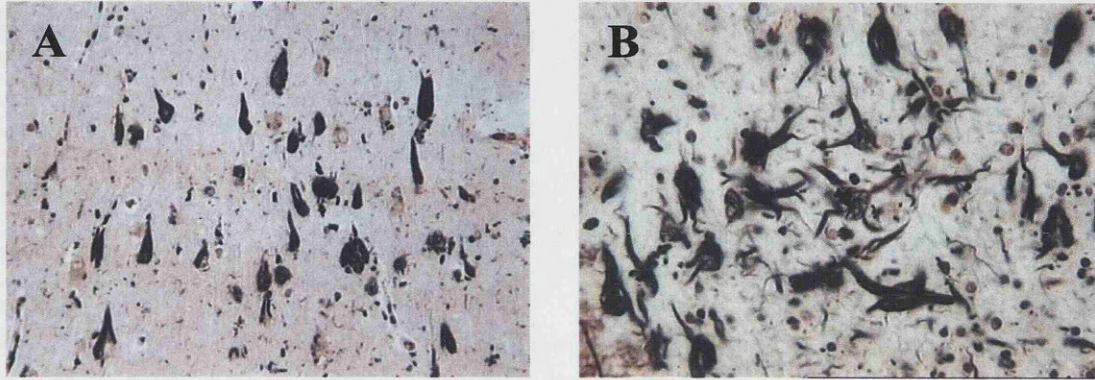


Figura 3.- Secciones de tejido con tinción de plata.

A) ovillos neurofibrilares (x 40). B) Ovillos neurofibrilares en corteza entorrinal (x 100)

Mientras que la distribución del β -amiloide es aleatoria y no sigue aparentemente ningún patrón, los ovillos neurofibrilares, por el contrario, siguen un patrón de afectación regional totalmente predecible con mínimas diferencias entre individuos lo que ha llevado a determinar varias etapas histopatológicas tempranas y tardías de la EA. Esta determinación fue realizada por Braak y Braak (Braak y Braak, 1996), y se ha dividido en 6 estadios durante el curso de la EA:

- Estadios I y II o estados preclínicos, también llamados transentorrinos. Se caracterizan por la escasa presencia de ovillos neurofibrilares en la región transentorrinal y moderada en la región entorrinal e hipocampo.
- Estadios III y IV. Se caracterizan por una severa afectación de la capa superficial entorrinal (estadio III), y de la capa profunda de la región entorrinal (estadio IV). Las alteraciones en estas dos capas de la región entorrinal destruyen la transmisión de la información desde el isocórtex al hipocampo y viceversa, así como una interrupción de los circuitos límbicos.

- Por último, los Estadios V y VI o también llamados estadios isocorticales. Se caracterizan por el progresivo deterioro del hipocampo y de las áreas de asociación, llevando a la alteración de la memoria y de las funciones cognitivas, e incluso funciones del lenguaje, motoras, visuales etc.

Esta distribución en estadios neuropatológicos se correlaciona con la evolución clínica de la enfermedad. Se ha demostrado el paralelismo entre la disminución de memoria con cambios neurofibrilares y la formación de placas neuríticas en la corteza entorrinal y el hipocampo (estadios del I a IV). Asimismo la presencia isocortical de estos cambios (estadios de V a VI), se correlaciona con alteraciones clínicas severas. El estado transentorrinal (estadios del I a II), probablemente corresponde a estadios silenciosos de la enfermedad.

Estos estadios actúan como criterios neuropatológicos para confirmar la EA.

4. Mecanismos moleculares implicados en la degeneración neuronal en la EA.

En los últimos años, se ha acumulado gran cantidad de información relativa a los mecanismos moleculares implicados en la patogenia de la EA, derivada fundamentalmente de la experimentación con animales modificados genéticamente y cultivos celulares como modelo para el estudio de la EA. Como era de esperar desde que se observó la presencia de β -amiloide ($A\beta$) en neuronas degeneradas de pacientes con EA, las alteraciones en la estructura y/o el procesamiento de APP parecen jugar un papel relevante en la patogénesis de la enfermedad. Los cambios bioquímicos asociados de forma general con el envejecimiento como niveles elevados de radicales libres (Varadarajan y cols., 2000), alteraciones en el metabolismo energético (Gibson y cols., 1998), oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos (Butterfield y Stadtman, 1997) y alteraciones en la homeostasis iónica (Mattson, 2000) aparecen acentuados en el cerebro de pacientes de EA. Otros mecanismos destacados implican cambios en la organización del citoesqueleto como consecuencia de la hiperfosforilación de la proteína Tau, una respuesta inflamatoria crónica y una posible desregulación de los mecanismos que controlan el ciclo celular.

4.1. β -amiloide

La llamada hipótesis del β -amiloide ($A\beta$) propone que la acumulación progresiva de $A\beta$ a lo largo de la vida inicia una compleja cascada multicelular que incluye microgliosis, astrocitosis, formación de neuritas distróficas, daños patológicos en el citoesqueleto, pérdida de las funciones sinápticas y neurotransmisoras y; finalmente, la muerte neuronal por apoptosis (Selkoe, 2003). La figura 4 recoge, esquemáticamente, la secuencia de acontecimientos que eventualmente originarían la EA según Selkoe (2000).

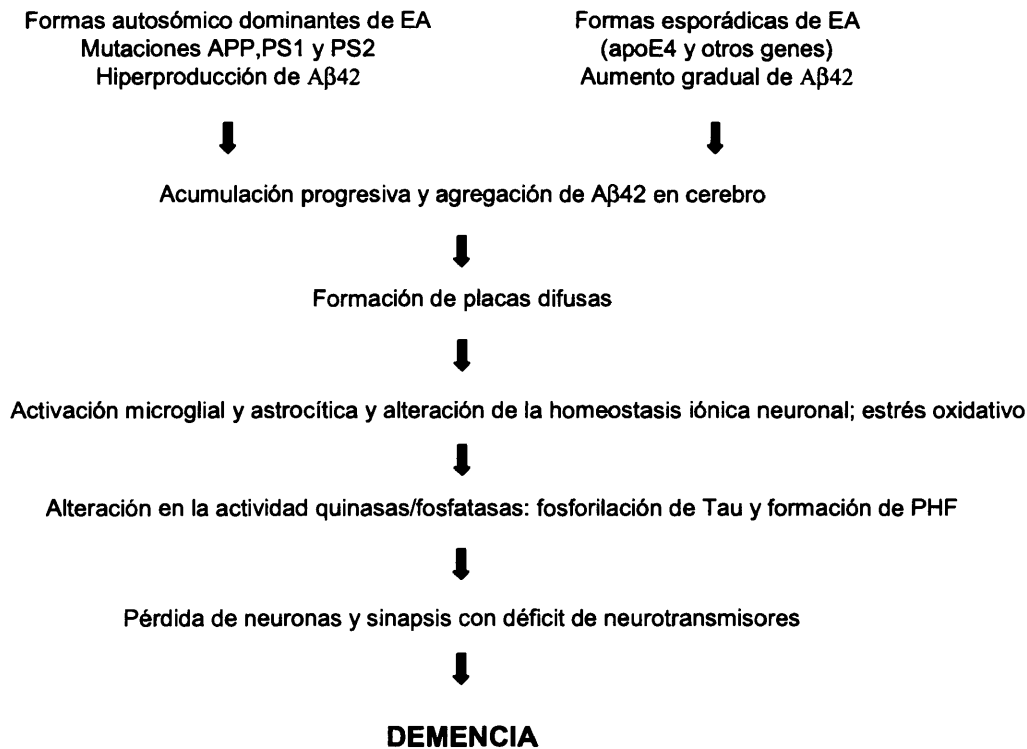


Figura 4.- Secuencia hipotética de etapas patológicas en la EA. Tomado de Alzheimer research forum (2003). <http://www.alzforum.org/home.asp>.

Esta hipótesis se sustenta en tres observaciones: 1) El efecto tóxico del $A\beta$ basado en experimentos *in vitro*, donde la adicción de $A\beta$ fibrilar se vió que era neurotóxica; bien actuando sobre la función mitocondrial (Kaneko y cols., 1995), la homeostasis del calcio (Clarke y cols., 1998) o a través de la interacción con APP (Lorenzo y cols., 2000). 2) Las mutaciones encontradas en la forma familiar de la enfermedad producen, bien directa o indirectamente, un aumento del $A\beta$ y por tanto mayor generación de pla-

cas (Goate y cols., 1991; Sherrington y cols., 1995, Rogaev y cols., 1995). 3) La sobreexpresión de APP a lo largo de la vida aumenta la deposición de A β como confirma el hecho de que pacientes con la trisomía del 21, cromosoma donde se localiza APP, desarrollan placas de A β a edades tempranas (Hardy y Allsop, 1991) y el descubrimiento de un nuevo tipo de EA familiar como consecuencia de la duplicación del locus de APP (Rovelet-Lecrux y cols., 2006).

El término A β se refiere a un fragmento de 40-42 aminoácidos que deriva de la proteína precursora de amiloide (APP). La APP es una glicoproteína de membrana que contiene en su secuencia la región A β , formada por 39-42 aminoácidos, situada entre el único dominio transmembranal y la larga región extracelular de la molécula (Glennner y Wong, 1984, Masters y cols., 1985). La región β -amiloide es liberada tras la acción proteolítica sucesiva de las llamadas β -secretasa (BACE) y γ -secretasa. Alternativamente, la APP sufre una degradación proteolítica, catalizada por la α -secretasa que libera una porción extracelular de APP (sAPP α) que no es amiloidogénica y que parece ser importante en los procesos de plasticidad neuronal (Mattson, 1997).

En contra de lo que se postuló inicialmente, se sabe ahora que A β es un producto normal del metabolismo de APP, que es producido por todo tipo de células y que circula por los fluidos extracelulares. La mayoría de A β generado intracelularmente es secretado. Los niveles de A β en el fluido cerebroespinal son de 3-8 nM, mientras que los plasmáticos suelen ser inferiores a 500 pM (Scheuner y cols., 1996), lo que sugiere que A β puede atravesar la barrera hematoencefálica (Poduslo y cols., 1999) y acumularse en el cerebro.

El aumento en los niveles estacionarios de A β se debe no sólo a un aumento en la generación del péptido, sino también, a una menor actividad de los enzimas que degradan la molécula. Algunas proteasas cerebrales que pueden estar implicadas en este proceso son la neprilisina, de la familia de las metaloproteasas (Iwata y cols., 2000) y la enzima degradante de insulina (IDE) (Qiu y cols., 1998). Otro mecanismo que contribuye a disminuir el acúmulo de A β , es la fagocitosis de las fibrillas de amiloide por la microglía y su posterior hidrólisis en los lisosomas (Selkoe, 2003).

Los efectos de la acumulación de A β en los fluidos intersticiales del cerebro y, probablemente, intracelularmente (Gouras y cols., 2000), incluyen una respuesta inflamatoria exacerbada (McGeer y McGeer, 1995), un aumento en la generación de radicales libres (Keller y cols., 1998), mecanismos de oxidación de proteínas, lípidos y otras macromoléculas (Behl y cols., 1994); así como una mayor vulnerabilidad neuronal a la excitotoxicidad y apoptosis (Mattson, 2000). Otra consecuencia de la acumulación de A β es una alteración de la homeostasis iónica (Mattson y cols., 1992). El aumento en la entrada de Ca²⁺, desde el medio extracelular y su acumulación en la célula, parece jugar un papel importante en la neurodegeneración (Chittajallu y cols., 1998). Por otra parte, un aumento en la concentración intracelular de Ca²⁺ puede contribuir a una mayor fosforilación de Tau y desestabilización de los microtúbulos, ya que se ha descrito la participación de quinasas dependientes de Ca²⁺/Calmodulina (Ca²⁺/CaM) en la fosforilación de Tau (Yoshimura y cols., 2003).

Aunque la cascada patogénica del A β puede explicar el deterioro de las funciones cognitivas en la EA, aún quedan importantes cuestiones por resolver. Quizás la más significativa, es la que se refiere a la vulnerabilidad selectiva de las distintas poblaciones neuronales. Existen diferencias locales y regionales en la acumulación crónica de A β 42. En algunas zonas no se llegan a formar estructuras fibrilares como, por ejemplo, en el cerebelo, cuerpo estriado y tálamo, mientras que en otras zonas (hipocampo y corteza cerebral) tiene lugar la oligomerización y fibrilación de manera importante. Estas observaciones sugieren la existencia de factores pro y anti-agregantes de A β en las formas oligoméricas tóxicas. También, se debe considerar el hecho de que hay una vulnerabilidad selectiva de ciertas neuronas a la citotoxicidad inducida por A β (Selkoe, 2002). Otros argumentos que cuestionan esta hipótesis son: en primer lugar que, salvo excepciones, numerosos estudios, han demostrado que la cantidad de depósitos de A β en cerebros de pacientes con EA, apenas guarda correlación con el grado de deterioro cognitivo o la cuantía de la pérdida neuronal o sináptica que éstos experimentan (Arriagada y cols., 1992; Gómez-Isla y cols., 1992); en segundo lugar, se ha detectado un número significativo de placas de A β en ancianos no dementes; en tercer lugar que, generalmente, los depósitos de A β no se encuentran rodeados de daño tisular detectable. Pero quizás, el principal argumento en contra de la hipótesis de la cascada amiloide es que, pese a

todos los esfuerzos, aún no se han identificado con certeza cuales son las especies neurotóxicas de A β *in vivo*, ni el mecanismo por el cuál éstas interfieren con el normal funcionamiento de las neuronas y sinápsis.

Se piensa que la toxicidad de A β se debe fundamentalmente a su acumulación, más que al daño que causa su agregación formando placas (Selkoe 2003). A β puede aparecer de diversas formas: monómeros, dímeros, oligómeros y polímeros que son los que forman las fibrillas presentes en las placas neuríticas y en la microvasculatura. Las teorías más recientes proponen que no es el A β fibrilar el responsable de la interrupción de la plasticidad sináptica y de la muerte neuronal, sino oligómeros solubles del péptido, es decir la forma prefibrilar del A β . Sin embargo, las evidencias del papel de los oligómeros de A β soluble como causa de la pérdida sináptica y del subsiguiente síndrome de demencia en los pacientes todavía no son del todo claras.

Pese a que de momento sólo tenemos un conocimiento parcial de los mecanismos fisiopatológicos y patogénicos que subyacen a la EA y que en la hipótesis de la cascada amiloide está pendiente establecer de forma firme la relación causa efecto entre el acúmulo de A β y la formación de ovillos neurofibrilares o de la pérdida de neuronas y sinápsis; esta hipótesis para explicar la enfermedad, ha permitido algo tan importante como es la puesta en marcha de novedosas estrategias terapéuticas, cuyos sitios potenciales de intervención son destinados en primer lugar, a disminuir la producción de A β actuando sobre las β y γ secretasas (Scorer, 2001). En segundo lugar se ha trabajado activamente en conseguir aumentar la degradación de los depósitos de A β . En este sentido hay que destacar los buenos resultados conseguidos con la inmunización con A β en ratones (Morgan y cols., 2000; Janus y cols., 2000) y humanos (Hock y cols., 2002; McLaurin y cols., 2002). Estos trabajos impulsaron el desarrollo de una vacuna (Elan Pharmaceuticals, AN-1792) que comenzó a administrarse a pacientes. Sin embargo su uso tuvo que ser suspendido tras observar en algunos pacientes (6% de los casos) una respuesta neuroinflamatoria muy severa (Check, 2002; Nicoll, 2003). Tras el estudio de dos pacientes inmunizados con AN-1792 (Patton y cols., 2006), de los cuales sólo uno había desarrollado meningoencefalitis se observó que las placas de A β disminuyeron en ambos sujetos, por lo que llegaron a la conclusión que ni la titulación ni la actividad de

los anticuerpos era responsable de la meningoencefalitis. No obstante, la inmunización con AN-1792 produjo un aumento notable en el contenido de A β soluble y no eliminó depósitos de A β difuso (A β 17-42), de los cuales se sabe que no forman estructuras fibrilares ni provocan inflamación pero, que se ha descrito recientemente que tienen efectos tóxicos que se le atribuyen a su C-terminal (Wei y cols., 2006). Por estas razones se sigue investigando en la generación de nuevos anticuerpos que mejoren el resultado obtenido de la primera vacuna. En este sentido cabe destacar la generación de anticuerpos dirigidos contra el extremo C-terminal A β en ratones transgénicos (Levites y cols., 2006).

4.2. Hiperfosforilación de la proteína Tau.

La hiperfosforilación de la proteína Tau caracteriza a un conjunto de enfermedades neurodegenerativas llamadas Tauopatías que incluyen a la EA (Buee y cols., 2000).

Tau es una proteína asociada a los microtúbulos (MAP) que se expresa principalmente en el cerebro, aunque también se ha descrito su expresión en células no neuronales en cultivo como es el caso de fibroblastos humanos. Esta proteína se caracteriza por ser hidrofílica con una estructura filamentosa (Hirokawa y cols., 1988). Se han observado diferentes polipéptidos de Tau mediante el análisis de proteínas procedentes de extractos cerebrales. Esto se debe por un lado a que la proteína Tau es codificada por seis polipéptidos generados por procesamiento alternativo de ARN (Himmler, 1989) y por otro a los diferentes niveles de fosforilación de la proteína (Goedert y cols., 1992).

La función normal de la proteína Tau es ensamblar y estabilizar microtúbulos manteniendo la estructura íntegra del citoesqueleto (Lee y cols., 2001), aunque también puede jugar un papel importante regulando procesos como el transporte axonal (Mandelkow y cols., 2004). Se sabe que para que la proteína Tau funcione correctamente es importante la regulación de su estado de fosforilación. En la fosforilación normal de Tau están implicadas actividades tanto de quinasas como de fosfatasa. Una hiperactividad de quinasas paralela a una reducción en la actividad de fosfatasa (específicamente

PP2A, PP2B), da lugar una pérdida en el balance a favor de la fosforilación que conduce a la aparición de las enfermedades llamadas Tauopatías.

Se han propuesto al menos 77 sitios posibles de fosforilación de Tau en residuos de serina o treonina, como se observa en la figura 5. Estos sitios de fosforilación han sido divididos en dos grupos principales: aquellos que pueden ser modificados por quinasas dirigidas por prolinas, como es el caso de la quinasa glucogeno sintasa 3 (GSK3), quinasa dependiente de ciclina (CDK5), quinasas activadas por mitógenos (MAPK) como p38 o JNK y también, las quinasas activadas por estrés (SAPK). En el otro grupo están aquellos sitios que pueden ser modificados por quinasas independientes de prolinas, tales como quinasa reguladora de la afinidad del microtúbulo (MARK) o la proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} y calmodulina (CaMK II) (Imahori Uchida, 1997; Goedert y cols., 1997; Correas y cols., 1992; Drewes y cols., 1992; Scott y cols., 1993; Hanger y cols., 1992; Lucas y cols., 2001).

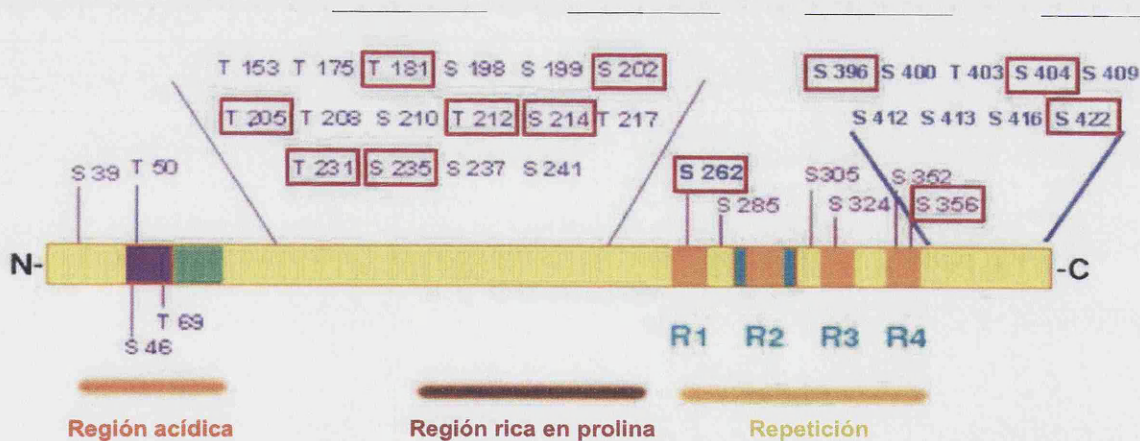


Figura 5.- Posibles sitios de fosforilación de la proteína Tau. Representación esquemática de los dominios de la proteína Tau y sus posibles sitios de fosforilación, se indica con rectángulos rojos los sitios de hiperfosforilación encontrados en los filamentos apareados helicoidales característicos de la EA. Los sitios de unión de la proteína Tau a microtúbulos se han marcado desde el R1 al R4

La fosforilación anormal de Tau en enfermedades neurodegenerativas esta asociada a sitios de fosforilación serina/treonina dirigidos por prolina (Lee y cols., 2001) (ver figura 5). Se cree que las quinasas que inician este proceso de hiperfosforilación son CDK5 y GSK3 β (Hanger y cols., 1992; Ishiguro y cols., 1992; Mandelkow y cols., 1992; Paudel y cols., 1993). CDK5 colocaliza con depósitos filamentosos de Tau y su

actividad está incrementada en algunas Tauopatías entre las que se incluye la EA (Shelton y cols., 2004). Del mismo modo, la GSK3 β , colocaliza con agregados de Tau hiperfosforilada (Ishizawa y cols., 2003). Por otra parte, se ha podido demostrar que el A β , actuando como antagonista de receptores de insulina, produce un aumento en la actividad de GSK3 β (Xie y cols., 2002) y, por tanto, en la hiperfosforilación de Tau (Álvarez y cols., 1999). Ver la implicación de la hiperfosforilación de Tau en la neurodegeneración es fácil, debido a que provoca su disociación de los microtúbulos y su agregación en los ovillos filamentosos insolubles (PHF). La disociación de Tau de los microtúbulos tiene como consecuencia la desestabilización del citoesqueleto y, por ende alteraciones en la geometría celular, el transporte intracelular y, en último término, la viabilidad neuronal (Smale y cols., 1995; Troncoso y cols., 1996; Evans y cols., 2000) (ver figura 6).

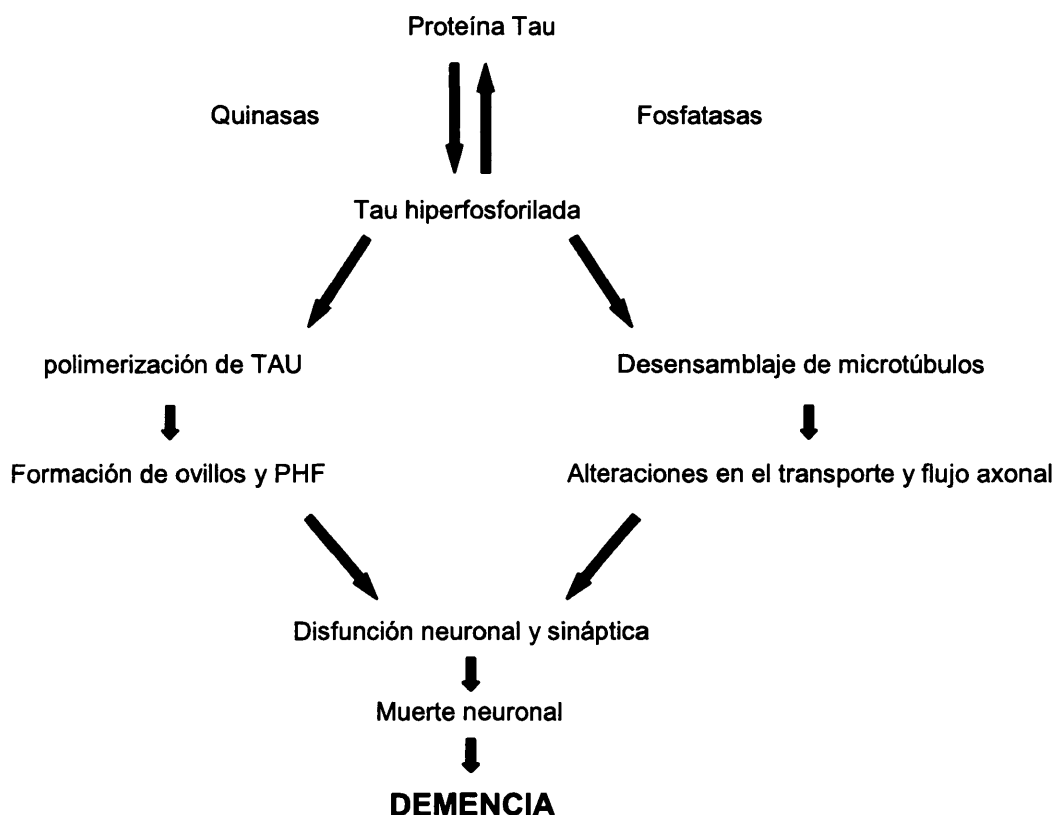


Figura 6.- Proteína Tau en la EA. La fosforilación de Tau está regulada por un balance entre múltiples quinasas y fosfatasas. La hiperfosforilación de Tau por un lado retiene a la proteína Tau normal y a los microtúbulos causando desensamble de microtúbulos y alteraciones en el transporte axonal y por otro lado se agrega en fibrillas insolubles. Tanto la formación de ovillos como la desorganización de microtúbulos, altera la función sináptica y neuronal. Los ovillos pueden degradarse por la vía ubiquitin proteasoma pero este proceso es insuficiente, provocando muerte neuronal (Blennow y cols., 2006)

4.3. Inflamación y EA

Una respuesta inflamatoria persistente y exacerbada parece ser una característica de la EA. La presencia de microglía y citoquinas inflamatorias, entre otros elementos, aparecen asociadas a las placas seniles en biopsias cerebrales postmortem de pacientes con EA, pero no de individuos no dementes (McGeer y McGeer, 1998). Del mismo modo, se han encontrado signos de activación de la microglía en modelos murinos de EA que desarrollan abundantes placas de amiloide (Bornemann y cols., 2001). Por otro lado, existen estudios epidemiológicos que sugieren que el tratamiento prolongado con antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) retrasa la aparición y la progresión de la EA (McGeer y McGeer, 1996). Basándose en estas evidencias, se propuso que la neuroinflamación podría ser una de las causas de la EA. Si este fuera el caso, es evidente que tendría importantes implicaciones en la búsqueda de nuevos tratamientos. Alternativamente, la inflamación podría ser consecuencia del proceso patológico y no influir sustancialmente en la progresión de la enfermedad. También se ha considerado la posibilidad de que la inflamación induzca una respuesta inmune beneficiosa que pudiera limitar el avance de la enfermedad, en cuyo caso, la inhibición del proceso inflamatorio no sería deseable.

El desarrollo de anticuerpos específicos en el año 1980 hizo posible identificar, en material de autopsia de enfermos de EA, la presencia de proteínas del complemento y la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en la microglía alrededor de las placas de β -amiloide (Eikelenboom y Stam, 1982; McGeer y cols., 1988). Desde entonces muchos estudios han confirmado la expresión anómala de citoquinas, proteínas del complemento etc., asociadas con la respuesta inmune e inflamatoria (Akiyama y cols. 2000). Más recientemente, estudios de genómica, comparando la expresión de genes en regiones vulnerables de pacientes de EA y donantes controles de edad aproximada, han confirmado estos hallazgos y desvelado un aumento de expresión de otros genes relacionados con procesos inflamatorios, como es el caso de IL-1a, IL-1b, COX-2 o NF- κ B (Blalock y cols., 2005; Colangelo y cols., 2002). En resumen, los estudios neuropatológicos y de expresión genética muestran, de forma inequívoca, la activación de la respuesta inmune e inflamación en la EA. Sin embargo, estos estudios no

permiten discriminar si el proceso inflamatorio aparece antes de la patología o es una reacción compensatoria al proceso degenerativo. Hay que tener en cuenta, además, que muchos de los factores inmunes y proteínas inflamatorias tienen múltiples funciones y su mera presencia no indica si tiene efectos beneficiosos o perjudiciales.

Un descubrimiento clave en relación a inflamación-EA fue la demostración de que el β -amiloide es un potente activador del complemento (Rogers y cols., 1999). La activación del complemento en la EA se había demostrado previamente (Eikelenboom y Stam, 1987), pero no se habían encontrado anticuerpos asociados con las lesiones histopatológicas de la EA. Posteriormente se pudo demostrar que el β -amiloide activa el complemento por un mecanismo distinto a la clásica activación por anticuerpos y que consiste en su unión a la cola de colágeno de C1q (Webster y cols, 1999). La activación del complemento da lugar a la producción de toxinas anafilácticas que a su vez amplifican el proceso inflamatorio.

Además de iniciar la respuesta inmune activando el complemento, el A β participa en el proceso neuroinflamatorio a través de varios mecanismos: a) activación de factores de transcripción como por ejemplo NF- κ B y AP-1 (Kaltschmidt y cols., 1997; Ferrer y cols., 1997); b) mediante la activación del receptor CD40 (Tan y cols., 1999); y c) mediante el receptor γ activador de proliferación de peroxisomas (PPAR γ) (Sun y cols., 2002).

En apoyo de que la neuroinflamación tiene consecuencias deletéreas en la EA están los estudios epidemiológicos, que mostraron una menor incidencia de EA en pacientes de artritis con tratamientos prolongados con AINEs (McGeer y Rogers, 1992). Por otra parte, también en modelos murinos de EA, se ha observado la eficacia de ciertos AINEs reduciendo las placas de amiloide, la activación de la microglía y disminuyendo los niveles locales de IL-1a (revisado en Morgan y cols., 2005). No obstante, hay una gran disparidad de resultados, tanto entre los estudios epidemiológicos como en los estudios con ratones transgénicos, dependiendo de la droga utilizada, tiempo de administración o de factores desconocidos. Una posible explicación para estas discrepancias puede ser la observación de que los AINEs tienen efectos adicionales a los puramente antiinflamatorios. En la actualidad, existen en el mercado docenas de AINEs con distin-

ta especificidad por COX-1 y COX-2 y otras posibles dianas. Es destacable la observación de que los AINEs que han dado mejores resultados en ratones transgénicos que sobreexpresan la APP humana han sido los que actúan sobre COX-1 o sobre rutas alternativas, como la activación de PPAR γ o γ -secretasa; mientras que los ensayos clínicos en humanos que no han mostrado resultados beneficiosos han tenido como protagonistas los inhibidores específicos de COX-2 (Wyss Coray, 2006).

En la actualidad, se están realizando ensayos clínicos con drogas que no dependen de la actividad de COX-2. Destacan los efectos de flurbiprofeno y su enantiómero. La fase II de un ensayo con R-flurbiprofeno (flurizan), de doce meses de duración, acabó recientemente mostrando cambios estadísticamente significativos en el declinar de las actividades cotidianas en pacientes con EA moderada. En un estudio de seguimiento paralelo y tras 21 meses de tratamiento se ha podido apreciar una desaceleración en el deterioro funcional y cognitivo (<http://www.miriad.com/alzheimers/flurizan.php>). La fase III de este ensayo ya está en marcha.

Como habíamos mencionado anteriormente, la inflamación puede jugar un papel protector en los procesos neurodegenerativos crónicos. La activación de la microglía parece facilitar la eliminación de placas de A β (Wilcock y cols., 2004). En consonancia con esta idea, anticuerpos anti-A β , inducidos por inmunización activa con péptidos A β sintéticos o inmunización pasiva, se mostraron muy eficaces reduciendo las placas de amiloide en ratones TgAPP, actuando en las células de la microglía (Monsonogo y Weiner, 2003). A la inversa, en ratones op/op con una disfunción de la microglía, ya que carecen del factor estimulante de macrófagos (M-CSF), se ha descrito la aparición de depósitos de A β en el parénquima cerebral (Kaku y cols., 2003). Estos estudios fueron la base para desarrollar la primera vacuna contra la EA. La inmunización con A β 42 (AN-1792, Elan Pharmaceuticals Inc), fue efectiva para la eliminación de las placas seniles, en un ensayo clínico realizado con 400 pacientes, pero también tuvo consecuencias negativas y algunos pacientes desarrollaron meningoencefalitis (Nicoll y cols., 2003).

En resumen, desde la descripción de la activación del complemento y la microglía en cerebros de pacientes de EA hasta los estudios en ratones modificados genéticamente

para estudiar el proceso de la neuroinflamación, se ha recorrido un gran camino. Sin embargo, aún no hay datos concluyentes de que la inflamación pueda estar en el origen de la patología. También el papel de los AINEs en la EA, es controvertido y no hay que olvidar el posible beneficio de la inflamación cuando se trata de identificar posibles dianas terapéuticas.

4.3. Estrés oxidativo y EA.

Se sabe que a lo largo de la vida de un individuo ocurren muchos cambios, uno de los más difundidos es el daño oxidativo. Aunque el oxígeno es esencial para la vida sus metabolitos conocidos como especies de oxígeno reactivas (ROS), pueden causar un daño celular importante. Se sabe que, aproximadamente, el 1% del flujo mitocondrial de electrones puede generar ROS, los cuales son detoxificados por antioxidantes celulares. Cuando los niveles de ROS exceden la capacidad antioxidante de la célula ocurren unas condiciones deletéreas conocidas como estrés oxidativo. La acumulación de ROS, que incluye H_2O_2 , radicales hidroxilos y el anión superóxido, tiene como consecuencia la oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos, daños en el ADN y, últimamente, se ha visto que puede causar muerte celular vía apoptosis y necrosis. Indirectamente, a través de la interacción de los radicales hidroxilos con óxido nítrico, pueden interferir con la función de algunas proteínas introduciendo grupos nitrito en los residuos de tirosina. Dado que las neuronas tienen una alta tasa metabólica, limitado potencial de regeneración, y relativamente bajos niveles de antioxidantes, se piensa que son particularmente vulnerables a las ROS. Los estudios en cerebros humanos postmortem han implicado repetidamente el estrés oxidativo en la muerte neuronal, particularmente en trastornos neurodegenerativos tardíos. Por ejemplo, se ha encontrado incremento en varios biomarcadores de estrés oxidativo en regiones enfermas de tejido cerebral postmortem en pacientes de esclerosis amiotrófica lateral (ELA), enfermedad del prión, enfermedad de Huntington y parálisis supranuclear progresiva (Andersen, 2004; Barnham y cols., 2004). El análisis de necrosis de pacientes con EA también ha revelado la existencia de todos estos marcadores de estrés en zonas afectadas por la enfermedad junto con abundantes placas neuríticas y ovillos neurofibrilares (Sayre y cols., 2001). Signos de estrés oxidativo también se han encontrado en células extraneurales de pacientes con EA (Mecocci y cols., 1998). Estas observaciones sugieren que el estrés oxidativo no es una me-

ra consecuencia de la enfermedad, sino que puede estar genéticamente determinado (Eckert y cols., 2003). Algunos autores han sugerido que las alteraciones en la función mitocondrial y el estrés oxidativo son eventos iniciales en la patogénesis de la EA (Castellani y cols., 2002; Nunomura y cols., 2001).

Desde hace tiempo se piensa que A β juega un papel importante en la generación de ROS (Butterfield y cols., 1994; Behl y cols., 1994) y que ésta puede ser la causa de una mayor vulnerabilidad de ciertas neuronas a la muerte celular por apoptosis. Esta idea se apoya, entre otras, en las siguientes observaciones: a) Las acciones neurotóxicas de A β se pueden bloquear con antioxidantes (Kaltschmidt y cols., 1997), b) La sobreexpresión de mutantes humanas de APP, PS1 o PS2, produce en cultivos celulares una alteración de la función mitocondrial, un aumento en los niveles de superóxido y apoptosis (Guo y cols., 1999; Perry y cols., 2002). Resultados similares se han obtenido con células neurales y extraneurales procedentes de animales modificados genéticamente para sobreexpresar mutaciones en APP o PS (Guo y cols., 1999; Matsuoka y cols., 2001; Eckert y cols., 2001a, 2001b, 2003).

Los mecanismos moleculares implicados en la inducción de estrés oxidativo y muerte neuronal por A β no son del todo conocidos. Se ha sugerido que A β puede deteriorar la función colinérgica (Li y Smith, 1996), y alterar la homeostasis de Ca²⁺ (Guo y cols., 1997; Mattson, 2002). Recientemente, se ha sugerido que el estrés oxidativo inducido por A β puede ser una presión mitótica que fuerce a ciertas neuronas a una entrada aberrante en el ciclo celular (Klein y Ackerman, 2003).

4.5. Ciclo celular y EA.

La última y quizás la más controvertida teoría para la patogénesis de la EA plantea que una de las posibles causas de la pérdida neuronal es debida a la reactivación del ciclo celular en neuronas diferenciadas (Arendt y cols., 1996; Yang y cols., 2001).

La teoría explica el interesante paralelismo entre el desarrollo del cerebro y la EA. Así, los cambios cognitivos y funcionales que ocurren en la EA se corresponden con un modelo inverso a lo que ocurre en el desarrollo (Reisberg y cols., 2002). La EA devasta, paso a paso, la red neuronal responsable de las funciones cognitivas (Nagy y cols.,

1998; Arendt, 2003; Braak y cols., 1991), mediante un mecanismo que afecta más severamente a regiones del cerebro que son ontogénicamente y filogenéticamente, las más recientes (Arendt, 2000, 2003).

En el desarrollo del cerebro las neuronas se integran en redes sinápticas una vez que se haya completado la proliferación, migración y diferenciación del progenitor neuronal. Las señales celulares que controlan la conectividad y la plasticidad sináptica también representan las señales ambientales que mantienen las neuronas en estado diferenciado, impidiendo la reactivación de las señales que conducen a la migración o proliferación. Este papel dual de señales morforregulatorias representa un riesgo inherente para las neuronas con un alto grado de plasticidad sináptica ya que, en algunas circunstancias, se puede producir una reactivación errónea del ciclo celular que puede, finalmente, desencadenar la muerte celular en las neuronas (Arendt, 2003).

4.5.1. Alteraciones mitóticas en la EA.

Las evidencias que demuestran una reactivación del ciclo celular en neuronas son numerosas. Los estudios de Vicent y Davies fueron los primeros en mostrar la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular en neuronas procedentes de cerebros con la EA (Vicent y cols., 1996). Posteriormente otros laboratorios han descrito un amplio número de proteínas del ciclo celular en neuronas de biopsias cerebrales de individuos afectados con EA (Arendt y cols., 1996, McShea y cols., 1997, Nagy y cols., 1997, Busser y cols., 1998). Estos estudios se basan principalmente en evidencias inmunocitoquímicas que muestran la reaparición de quinasas del ciclo celular, de sus activadores y de sus inhibidores, y por lo tanto, ofrecen sólo apoyos indirectos de que las neuronas están entrando en un ciclo celular real. Las evidencias directas vinieron con Yang y cols. en el año 2001. Estos autores mediante el uso de fluorescencia de hibridación in situ (FISH), pudieron demostrar la replicación del ADN en 4 loci de 3 cromosomas distintos en una fracción significativa del hipocampo de EA, sin que este proceso ocurriera en otras zonas cerebrales de los mismos sujetos no afectadas por la patología o en neuronas de hipocampo de individuos no dementes (figura 8).

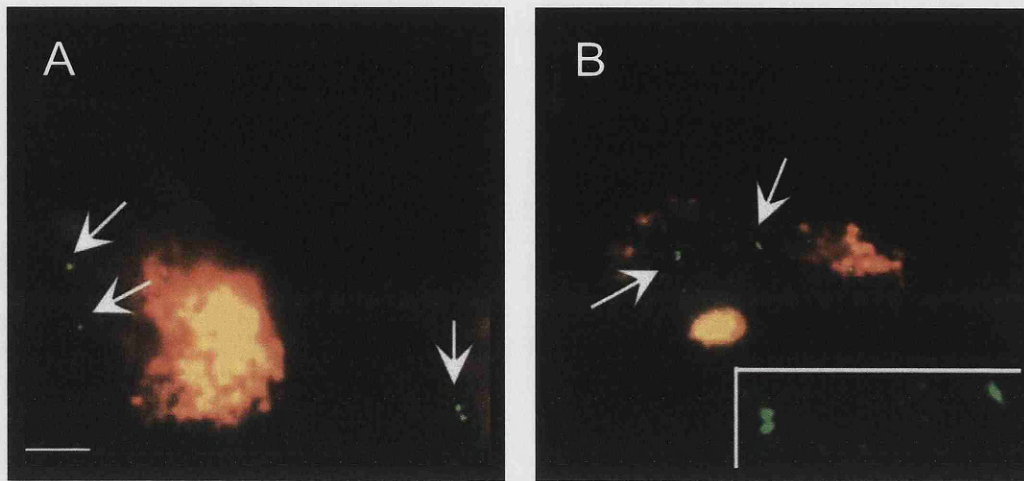


Figura 8.- FISH aplicado a neuronas de cerebros de pacientes con EA y a controles de la misma edad. Se muestran neuronas del núcleo basal de Meynert procedentes de cerebros de individuos controles y de EA, marcadas con una sonda que reconoce el gen BACE 1 que se localiza en el cromosoma 11. Se encontraron neuronas poliploides en cerebros de pacientes con EA (panel B). Sin embargo, no se encontró poliploidia en las neuronas procedentes de cerebros de individuos controles (panel A). Escala 10 μ m.

Por otro lado, hay que considerar la posibilidad de que la desregulación del ciclo celular podría estar implicada en la generación de las dos características neuropatológicas más importantes de la enfermedad: la formación de ovillos neurofibrilares y la generación de placas de amiloide. Uno de los factores más destacados de la fase G₂ y generalmente del ciclo celular es la activación de las quinasas necesarias para que la célula progrese a través de las diferentes etapas del ciclo (Massagué, 2004). La activación de estas quinasas está asociada con una disminución de la actividad de fosfatasa y una gradual desestabilización de microtúbulos en un intento de preparar a la célula para la citocinesis. La desestabilización de los microtúbulos aumenta el pool de Tau libre no unido a tubulina y que puede ser fácilmente fosforilado. De esta forma, se dificulta el re-acoplamiento de Tau a los microtúbulos y se facilita la formación de PHF típico de los ovillos. Durante G₂, también se altera el estado de fosforilación de otras proteínas, como es el caso de la proteína APP, de manera que se producen cambios en su procesamiento, dando como resultado la producción de fragmentos β -amiloide (Suzuki y cols., 1994). Podemos decir, por tanto, que algunos cambios invariables de la enfermedad como la fosforilación de Tau o la expresión, fosforilación y metabolismo de la proteína precursora de amiloide (APP), en neuronas que están degenerando, son también factores de las células que se están dividiendo (Raina y cols., 2000; Zhu y cols., 2000).

El ciclo de división celular es un proceso altamente regulado con numerosos puntos de control para asegurar la normal proliferación celular en presencia de señales ambientales adecuadas. Los periodos asociados a la replicación del ADN (fase S) y la mitosis (fase M), están separados por periodos intermedios G_1 y G_2 . La progresión a través de las distintas fases del ciclo de división celular ocurre por la expresión y activación secuencial de diversas CDKs (quinasas dependientes de ciclinas) (Grana y cols., 1995), que a su vez dependen de la presencia de reguladores positivos y reguladores negativos.

La reentrada de células arrestadas en G_0 a G_1 del ciclo celular es mediada por la expresión y activación de complejos ciclina D/CDK4,6 inducida por la presencia de factores de crecimiento mitóticos. La transición de G_1 a S es regulada por la activación de complejos ciclina E/CDK2 (Sherr y cols., 1994). La ausencia de ciclina E o la inhibición de ciclina E/CDK2 por $p21^{Cip1}$ (p21), $p27^{Kip1}$ (p27) y p53, podría causar el paro de la etapa G_1 . El siguiente destino de las células paradas en G_1 depende de la presencia o ausencia de ciclina A (Grana y cols 1995). En ausencia de ciclina A, las células retornan a G_0 y se rediferencian; sin embargo en presencia de ciclina A las células entran en división, pierden la capacidad de rediferenciarse y; si no son capaces de completar el ciclo mueren por apoptosis (Meikrantz y Schlege, 1995). En células proliferantes, esta alternativa, progresión, arresto o apoptosis, tiene como objetivo prevenir la transmisión de los posibles daños en el material genético. En células altamente diferenciadas como las neuronas, este mecanismo previene la generación inadecuada de nuevas células que no podrían ser integradas en los circuitos neuronales existentes (Copani y cols., 2001). En otras palabras: la entrada inadecuada en el ciclo celular de células altamente diferenciadas produce, en último término, la muerte celular.

El análisis de la expresión de proteínas del ciclo celular en neuronas procedentes de necropsias de individuos con la EA, permitió elucidar la progresión de las células a través de las distintas fases del ciclo. Este análisis reveló la presencia de ciclina D_1 y CDK4 en neuronas enfermas sugiriendo que las neuronas vulnerables en la EA no están permanentemente en fase quiescente (Mcshea y cols., 1997; Nagy y cols 1997). La presencia de ciclina E/CDK2 indicó que las neuronas pasan a G_1 (Nagy y cols 1997). La presencia de replicación del ADN sugirió que las neuronas susceptibles pueden completar casi la fase S (Yang y cols., 2001). Adicionalmente, la expresión aberrante de ciclina

B1/ CDK2 indicó que las neuronas que se degeneran en EA pueden incluso, en algunos casos, alcanzar la fase G₂ (Smith y cols., 1995). Sin embargo, nunca se han encontrado evidencias de mitosis, lo que sugiere que la re-entrada en ciclo, como muestra la expresión de estos marcadores, conduce a la muerte neuronal (Copani y cols 2001; Herrup 2004). Dicho de otro modo, las neuronas están comprometidas a permanecer en bloqueo permanente del ciclo celular, pero si por alguna razón se fuerza la entrada en ciclo, mueren (Lee y cols, 1992).

4. 5. 2. Reactivación del ciclo celular y muerte neuronal.

Mientras que la relación existente entre ciclo celular, muerte celular y diferenciación está bien documentada, fundamentalmente, en lo que se refiere a los procesos neoplásicos (Piacentini y cols., 1993) o al desarrollo del SNC durante la embriogénesis (Ross, 1996). Se sabe mucho menos del control de estos procesos en células altamente diferenciadas, como las del sistema nervioso.

En 1993, Heintz postuló que un descontrol del ciclo celular podría originar la muerte de neuronas diferenciadas. Se basaba en el hecho de que los tumores neuronales son muy raros, y dedujo que las células neuronales debían ser, de alguna manera, resistentes a la transformación neoplásica (Heintz, 1993). Por otra parte, la evidencia experimental demostró que la expresión de oncogenes en células neuronales causaba su muerte en lugar de la proliferación celular (Feddersen y cols., 1992). Recíprocamente, la inhibición farmacológica del ciclo celular o la expresión ectópica de CDKIs (inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas), protege a las neuronas frente a agentes inductores de muerte celular (Giovanni y cols., 1999; Osuga y cols., 2000; Knockaert, 2002).

Desde estos primeros trabajos, que sugerían una relación causal entre activación del ciclo celular y muerte neuronal, se han realizado numerosos estudios *in vitro* que han confirmado las consecuencias negativas del intento de neuronas diferenciadas de iniciar un ciclo de división celular. Así por ejemplo, se ha observado que neuronas de retina de pollo cultivadas en presencia del factor de crecimiento nervioso, insulina y neurotrofina-3, sufren apoptosis previa entrada en ciclo celular, y que este fenómeno se acompaña de un aumento en la expresión de la ciclina B₂ (Frade, 2000). Más reciente-

mente, Smith y cols. han demostrado mediante infección de neuronas con adenovirus que expresan el oncogen c-myc, que se produce replicación del ADN y que las células progresan hasta G₂ antes de su muerte (McShea y cols., 2006). La administración de roscovitina, un inhibidor de CDKs (quinasas dependientes de Ciclinas), previene la progresión a través del ciclo y la muerte celular por apoptosis. Estos resultados demuestran que aunque algunas neuronas retienen la capacidad de responder a factores de crecimiento entrando en el ciclo celular, esta estimulación produce muerte celular en lugar de proliferación. Asimismo, experimentos realizados en modelos animales y observaciones realizadas en otras enfermedades neurodegenerativas, apoyan directa o indirectamente la hipótesis de que la entrada en el ciclo celular conduce a la muerte neuronal. Por ejemplo, ratones deficientes en la proteína del retinoblastoma (Lee y cols., 1992) o ratones con la mutación “Harlequin” (Hq) (Klein y cols., 2002), presentan neurodegeneración tras la entrada aberrante en ciclo celular. Por otra parte, ratones transgénicos (Tg) que expresan el oncogen viral antígeno T de SV40 bajo el promotor del gen *pcp-2* específico de células de Purkinje desarrollan ataxia cerebelosa (Feddersen y cols 1992). Igualmente, los ratones Tg que expresan el mismo oncogen bajo el control del promotor de rodopsina, son ciegos, como consecuencia de la pérdida de neuronas de la retina (Al-Ubaidi y cols 1992). En células de Purkinje, y neuronas estriadas de ratones nulos para el gen *atm* (ataxia-telangiectasia) se han detectado evidencias de entrada aberrante en ciclo celular y duplicación del material genético (Yang y Herrup; 2005). En ninguno de estos casos se observó la aparición de tumores. En otras enfermedades degenerativas no relacionadas con la demencia, también se ha observado muerte neuronal asociada con eventos del ciclo celular. Es el caso de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), donde se ha observado un aumento en la expresión de ciclina D1 y una redistribución del factor de transcripción E2F-1 en neuronas afectadas (Ranganathan y Bowser, 2003).

4. 5. 3. Apoptosis neuronal

La idea de que la muerte neuronal ocurre por apoptosis en la EA fue sugerida por primera vez por Su y cols en 1994, cuando mostraron evidencias de fragmentación de ADN en neuronas de cerebros de individuos con EA. Posteriormente se han encontrado numerosas evidencias que la pérdida neuronal en la EA y otras enfermedades neurodegenerativas es el resultado de la activación de apoptosis (Roth, 2001). Así, por ejemplo,

se ha encontrado actividad caspasa en cerebros postmorten de individuos con EA (Selnick y cols, 1999, Stadelmann y cols 1999, Raina y cols., 2001). La mayoría de los estudios apuntan a una mayor contribución a la neurodegeneración, de la llamada apoptosis intrínseca, es decir, el proceso que depende de la integridad y función mitocondrial, más que de la activación de receptores de muerte (Yuan y Yankner, 2000). El daño en el ADN (hereditario o inducido), un aumento en el influjo de Ca^{2+} desde el medio extracelular y el estrés oxidativo o metabólico, son algunas de las causas que pueden alterar la permeabilidad de la membrana mitocondrial y la liberación de moléculas relevantes para el proceso de apoptosis (Kermer y cols., 2004). A pesar de las evidencias a favor de la activación de apoptosis en cerebros de pacientes de EA y de otras enfermedades neurodegenerativas, se discute si el término apoptosis es adecuado para describir pérdida neuronal en este tipo de enfermedades (Zhu y cols., 2006; Jellinger, 2006). La controversia radica fundamentalmente en el corto tiempo que se necesita para completar la apoptosis en cultivos neuronales y la naturaleza crónica de la patología neurodegenerativa. Se sabe que algunos de los mediadores de la cascada apoptótica pueden regular la apoptosis de forma bidireccional mostrando actividad pro- o anti-apoptótica. Por esta razón, se ha sugerido que en el cerebro de pacientes de EA, las proteínas reguladoras de apoptosis podrían, en realidad, actuar abortando el proceso apoptótico, prolongando de esta forma la supervivencia de las neuronas afectadas. Este proceso que se ha denominado abortosis o apoptosis abortiva (Raina y cols., 2003), implicaría que las neuronas afectadas pierden incluso la capacidad de controlar su propia muerte programada y proporciona a estas neuronas una señal aberrante de supervivencia.

4.5.4. La entrada en ciclo es necesaria pero no suficiente para causar pérdida neuronal.

Aunque la aberrante entrada del ciclo celular de neuronas susceptibles puede contribuir a la pérdida neuronal de la EA, las proteínas mitóticas no están exclusivamente asociadas con el final del estado neuropatológico, sino más bien con cambios neuronales muy tempranos que ocurren en la enfermedad (Busser y cols., 1998; Yang y cols., 2003; Yang y Herrup, 2006). De hecho los marcadores del ciclo celular aparecen antes que los cambios citopatológicos, como se ha demostrado en 3 modelos de ratón para la EA que desarrollaban placas de amiloide. En estos ratones se observó que la expresión de proteínas reguladoras y duplicación del material genético se producía meses antes de

la aparición de las placas de A β y del proceso inflamatorio (Yang y Herrup, 2006). La observación de la presencia de marcadores del ciclo celular en casos de pacientes con DCL, también sugiere que la entrada en ciclo celular es un acontecimiento temprano en el transcurso de la enfermedad (Yang y cols., 2003).

El trabajo de Yang y Herrup (2006), sugería que la re-entrada en ciclo celular de neuronas vulnerables es un factor necesario, pero no la causa inminente de la muerte neuronal, al menos en ratones. Aparentemente el tiempo que transcurre desde que las neuronas inician un ciclo de división celular y su muerte es considerable (Busser y cols., 1998; Yang y cols., 2001). Estos autores estimaron, de forma independiente y con técnicas distintas, el tiempo que transcurre entre estos dos procesos en cerebro humano. Durante todo este tiempo, cercano al año, se puede encontrar neuronas aneuploides sin grandes cambios en su funcionalidad (Hock y Lamb, 2001). Se puede hacer dos interpretaciones de estas observaciones. En primer lugar, se puede pensar que la re-entrada en ciclo celular no es suficiente por sí misma para causar la muerte neuronal, sino que necesita el concurso de otro estímulo. A favor de esta interpretación está la llamada teoría de los dos impactos (Zhu y cols., 2006), que sostiene que la entrada aberrante en ciclo celular y el estrés oxidativo son necesarios para el avance de la enfermedad; si bien cada uno de estos procesos por separado podrían iniciar el proceso patológico. En esta línea de pensamiento, estudios recientes han demostrado la presencia de marcadores del ciclo celular tras la muerte neuronal inducida por hipoxia e isquemia en roedores (Kuan y cols., 2004). En segundo lugar, se ha sugerido que la entrada de ciertas neuronas en ciclo de división celular, puede tener un papel protector en situaciones de estrés (Yang y cols., 2006) y que, de forma análoga a lo que ocurre en ciertas circunstancias durante el desarrollo, las neuronas se benefician de tener copias extra de cada alelo (Claycomb y cols., 2004). No obstante, el resultado final de la entrada en ciclo de división celular tiene consecuencias letales para la neurona, pero el largo tiempo que transcurre entre el inicio del ciclo y la pérdida neuronal, sugiere que *in vivo* debe haber otros factores implicados en la muerte neuronal.

La presencia de marcadores del ciclo celular en ancianos no dementes (Nagy y cols., 1998), también sugiere que la estimulación mitogénica por sí misma no es suficiente para causar la EA (Arendt, 2003). La diferencia entre el cerebro de individuos

controles y enfermos de EA no está en la reactivación del ciclo celular, sino en cuándo se consigue el arresto del proceso en unas células que no pueden dividirse. En el cerebro adulto normal parece existir mecanismos de control que consiguen frenar rápidamente la progresión de las neuronas a través del ciclo y éstas pueden ser rescatadas antes de la transición de G₁ a S. En el cerebro de los pacientes de EA se sobrepasa este punto de control, tiene lugar la replicación del ADN y la re-diferenciación ya no es posible (Yang y cols., 2001; Nagy., 2000). La progresión de las neuronas hasta la fase G₂ del ciclo celular produce la muerte de la célula o graves lesiones que comprometen su funcionamiento. La naturaleza del fallo en la regulación de G₁ a S en la EA se desconoce y aunque se ha detectado la expresión de inhibidores de quinasas dependientes de ciclina en neuronas vulnerables (Arendt y cols 1996; Ogawa y cols., 2003), su presencia no parece prevenir la progresión celular a través del ciclo. La causa de esta pérdida de función continúa sin ser explicada.

4.5.5. Mecanismos de señalización implicados en la reactivación del ciclo celular en la EA.

Una de las cuestiones más importantes por resolver, es determinar los acontecimientos que provocan la entrada de neuronas diferenciadas en un ciclo de división celular, que tiene consecuencias fatales. En otras palabras, queda por definir cuales son los mecanismos moleculares de señalización celular implicados en el binomio ciclo celular-muerte neuronal. La búsqueda de factores responsables de la formación de ovillos neurofibrilares y placas de A β en las neuronas afectadas por la EA, ha aportado algunas claves. Así por ejemplo, en los depósitos amiloideos se ha encontrado acumulación de factores de crecimiento como EGF (Styren y cols., 1990), β FGF (Gómez-Pinilla y cols., 1990), IGF-1 (Connor y cols., 1997) e ILs (Cacabelos y cols., 1994; Huberman y cols., 1994; Luterma y cols., 2000) que; tal vez, pudieran ser la causa de la entrada en ciclo celular de algunas neuronas. También, hay que considerar la posibilidad de que los depósitos de β -amiloide tengan, *in vivo*, un efecto neurotrófico, como se ha demostrado *in vitro* (Giovanni y cols., 1999; Wu y cols., 2000; Jordan-Sciutto y cols., 2001). Otros factores que pueden aumentar la presión mitótica en el cerebro de pacientes son: a) la pérdida de conexiones sinápticas, uno de los eventos iniciales de la EA (Masliah y cols., 1993; Nagy, 2000); b) el proceso inflamatorio crónico, a través de la producción de ci-

toquinas; c) el estrés oxidativo (Klein y Ackerman, 2003): el daño en el material genético inducido por los radicales libres a lo largo del tiempo ha sido considerado como una de las causas del intento de ciertas neuronas de dividirse. Por otra parte, también se ha sugerido que niveles elevados de homocisteína, considerado como un factor de riesgo de desarrollar EA y enfermedades cardiovasculares (Clarke y cols., 1998; Millar, 2003; Tyagi, 1998), puedan tener un efecto mitogénico como se ha demostrado en cultivos celulares (Majors y cols., 1997). El hecho de que el número de mujeres afectadas por la EA doble al de varones (Paykel y cols., 1994; Fratiglioni y cols., 2000) y que la EA se manifieste después de la menopausia, sugiere la posibilidad de que algunos factores hormonales puedan también contribuir al proceso neurodegenerativo. En este sentido, conviene resaltar la importancia de los estrógenos en el mantenimiento de las conexiones sinápticas (Pike, 1999; Wade y cols., 1999) y el papel de las hormonas tiroideas como señales de diferenciación para las neuronas (Denver y cols., 1999; Pérez Juste y Aranda, 1999). Sin embargo, recientemente, los resultados contradictorios que se han encontrado en el llamado estudio WHIMS (Women's Health Initiative Memory Study) en el que la terapia hormonal sustitutiva parecía aumentar el riesgo de demencia en mujeres postmenopáusicas (Shumaker y cols., 2003), han cuestionado el supuesto papel protector de los estrógenos. Paralelamente, se ha propuesto que otras hormonas del eje hipotálamo-pituitaria-gónadas pudieran estar implicadas en la patogénesis de la EA (Webber y cols., 2006). Específicamente, se sospecha del posible papel patogénico del aumento en la concentración de gonadotrofinas que se produce en la menopausia/andropausia (Casadeus y cols., 2006).

De todas las posibles vías de señalización celular que podrían conducir a la re-entrada en ciclo de división, merece ser destacada la que implica la participación de la APP como receptor de superficie, iniciando una cascada de acontecimientos que culmina con la replicación del ADN y apoptosis (revisado en Herrup y cols., 2004). Trabajos previos han observado que el efecto que produce la sobreexpresión de APP en neuronas, es inducir su muerte asociada con un aumento en la replicación del material genético (Chen y cols., 2000; Mcphie y cols., 2003). La idea de que la APP puede actuar como un receptor de superficie, se apoya en las siguientes evidencias experimentales: a) la secuencia de aminoácidos de la molécula de APP es semejante a la de las proteínas in-

trínsecas de membrana de tipo 1 (Kang y cols., 1987), b) la APP se expresa mayoritariamente en la superficie de las neuronas (Jung y cols., 1996; Storey y cols., 1996), c) el extremo carboxilo terminal de la APP interacciona con la proteína heterotrimérica G_0 (Nishimoto y cols., 1993).

La APP interacciona, a través de su extremo carboxilo, con un gran número de proteínas (Borg y cols., 1996; Chow y cols. 1996; Matsuda y cols., 2001; Taru y cols., 2002; Inomata y col., 2003; Mcphie y col., 2003). Dos de estas proteínas, la proteína 1 de unión a APP (APP-BP1) (Chow y cols. 1996) y la PAK3 (quinasa 3, activada por p21) (Mcphie y col., 2003), pudieran ser importantes para explicar la coexistencia de replicación de ADN y neurodegeneración en la EA. La APP-BP1 regula el tránsito entre las fases S y M del ciclo en células proliferantes (Chen y cols. 2000) y se ha descrito que cuando se sobreexpresa en neuronas produce muerte celular (Chen y cols. 2003). Además se ha demostrado un aumento en la expresión de APP-BP1 en neuronas que sobreexpresan las formas mutantes de la APP humana que causan la EA familiar (Chen y cols. 2003). Estas células son capaces de progresar hasta la fase S del ciclo y finalmente mueren por apoptosis. También se ha demostrado un aumento de la expresión de APP-BP1 en regiones vulnerables del cerebro de pacientes de EA comparada con la que tiene lugar en cerebros de individuos no dementes. La proteína PAK3 es una serín/treonín quinasa (Mcphie y col., 2003) que también está implicada en la síntesis de ADN y apoptosis neuronal inducida por las mutaciones patogénicas de APP. Una mutación en la quinasa PAK3, dominante negativa, inhibe la muerte neuronal por apoptosis y la síntesis de ADN inducidos por las mutantes patogénicas de APP, este efecto también es interrumpido por la delección del dominio de unión de PAK3 a APP o por la coexpresión de un péptido que representa este dominio de unión. Por último, la interacción de APP y la proteína G_0 , parece jugar también un papel relevante en la apoptosis inducida por las mutaciones de APP de la EA familiar. Se ha descrito que la toxina pertussis, conocido inhibidor de las proteínas G_0/G_i , es capaz de inhibir la apoptosis neuronal en las células que expresan estas mutantes (Herrup y cols., 2004). Estos efectos no se producen cuando se expresa una proteína G_0 , modificada para que no sea sensible a la toxina pertussis. Estas observaciones sugieren que la APP, a través de la interacción con otras proteínas que se unen a su extremo C-terminal, activa una cascada de señalización importante para el funcionamiento normal del cerebro, tal vez regulando la re-

modelación sináptica o neurogénesis durante el aprendizaje. Por tanto, una disfunción de esta vía de señalización podría conducir a las neuronas a entrar en un ciclo aberrante de división celular que les causa, en último término, la muerte.

La complejidad de los mecanismos de señalización que pueden causar la reactivación del ciclo celular en neuronas vulnerables, así como las evidencias de la participación de otros procesos y la existencia de factores de riesgo ha llevado a Nagy, 2000, 2006 a proponer un modelo de neurodegeneración que se detalla en la figura 7.

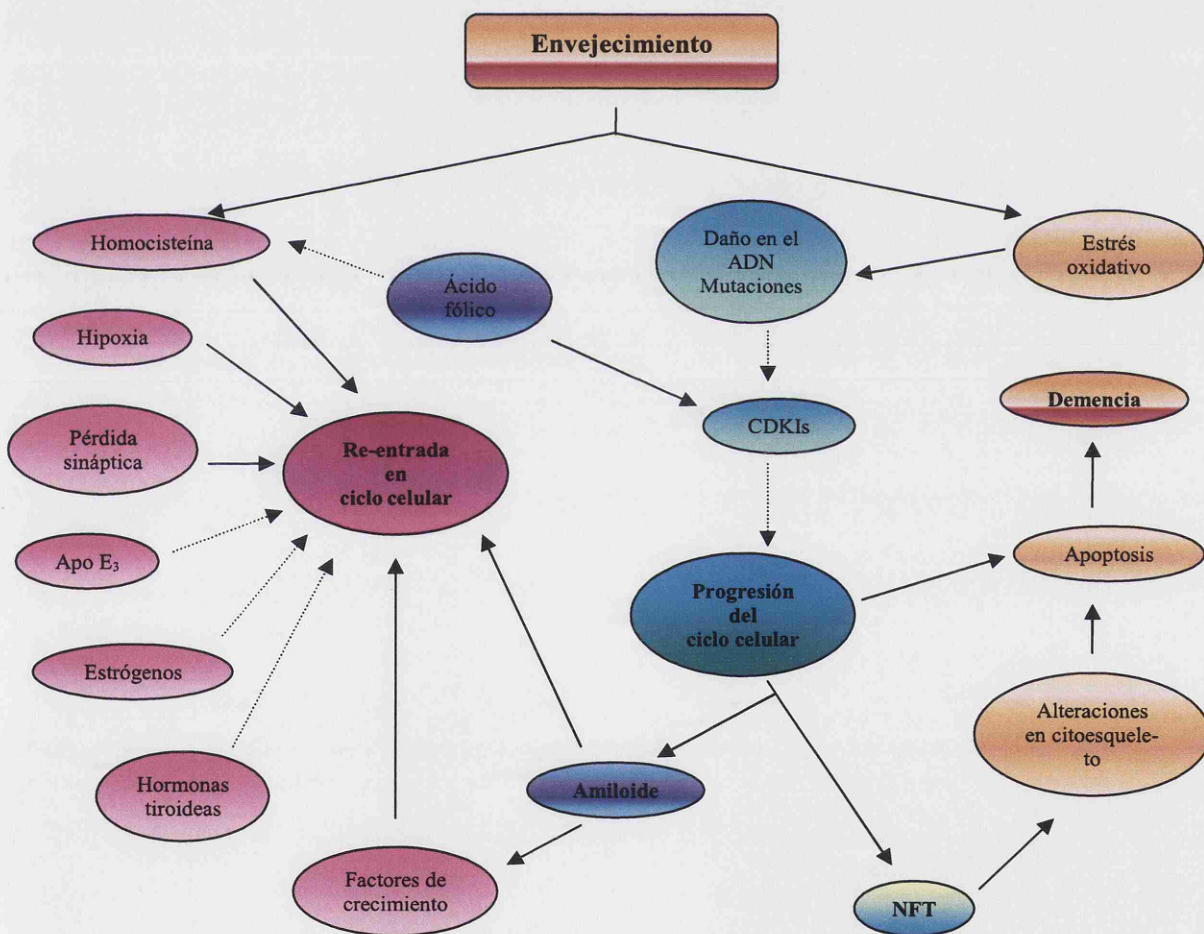


Figura 7.- Modelo de neurodegeneración en la EA propuesto por Nagy (2000, 2006)

Según este modelo, un desequilibrio entre las señales mitogénicas (β -amiloide, factores de crecimiento acumulados en las placas, ILs producidas por la activación de células de la glía, estrés oxidativo, niveles elevados de homocisteína, hipoxia cerebral) y los factores de diferenciación (estrógenos, hormonas tiroideas), junto con el fallo en los mecanismos de control del ciclo celular, dan lugar a que las neuronas entren y progresen hasta estadios avanzados del ciclo. Ante la imposibilidad de concluirlo con éxito, las células están abocadas a la muerte por apoptosis o a desarrollar un fenotipo patológico, que en último término podría causar la muerte neuronal. El hecho de que alguno de estos factores de riesgo pueda ser modificado farmacológicamente y la búsqueda de dianas claves en la regulación del ciclo celular, puede tener, quizás, importancia para la prevención de la EA.

5. Utilización de células extraneuronales en el estudio de la patogenia de la EA.

Un problema fundamental en el estudio de la fisiopatología de EA, ha sido el hecho de que el material de estudio provenga de autopsias, frecuentemente procedente de casos terminales de patología avanzada, que dificulta el estudio de procesos patológicos iniciales a nivel celular y/o molecular. En estos casos, es imposible separar aquellos eventos casuales de otros, inespecíficos, o que se deriven de la destrucción celular que provoca la enfermedad. Afortunadamente, la disponibilidad de modelos animales para el estudio de la EA ha permitido grandes avances en el conocimiento de algunos aspectos de la enfermedad. En los últimos 10 años numerosos modelos de ratón han sido desarrollados para reproducir los cambios bioquímicos e histopatológicos de la EA que incluyen las placas de amiloide y la patología de Tau (Ver tabla II), algunos de estos modelos muestran pérdida neuronal y sináptica y déficit en el comportamiento en varios aspectos del aprendizaje.

Tabla II.- Resumen de modificaciones genéticas de la EA en modelos de ratón.

Nombre	Transgen	Neuropatología	Comportamiento	Referencias
Ratones con mutaciones APP y Presenilinas				
NSEAPP	hAPP-751 (Silvestre)	Patología difusa de amiloide	Deterioro en la función cognitiva dependiente de la edad.	Quon y cols. 1991
PDAPP	hAPP (V717F-Indiana)	Placas neuríticas rodeadas de neuritas distróficas aparecen de los 6 a los 9 meses. Se observa astrocitosis, microgliosis y pérdida sináptica.	Déficit en el aprendizaje y la memoria espacial. Sueño reducido REM.	Chen y cols. 1998
Tg2576	hAPP (K670N, M671L-Sueca)	Placas neuríticas que aparecen entre los 9-12 meses microgliosis y astrocitosis. No se observa pérdida neuronal ni sináptica.	Déficit en el aprendizaje y la memoria	Westerman y cols., 2002
APP23	hAPP (K670N, M671L-Sueca)	Placas de amiloide detectadas a los 6 meses, microglia y astrocitos activados. Pérdida neuronal a los 18 meses. Angiopatía amiloide.	Progresivo deterioro de la memoria, adquisición y retención.	Van Dam y cols., 2003
APP/Lo	hAPP (V717I) Londres	Placas de amiloide densas y difusas detectadas a los 10-12 meses. Angiopatía amiloide a los 15 meses.	Déficit en el aprendizaje.	Moechars y cols., 1999
TgCRND8	hAPP (K670N, M671L, V717I Sueca, Indiana)	Depósitos de amiloide desarrollados a los 3 meses, con placas densas en el núcleo y patología neurítica a los 5-6 meses. Temprana mortalidad del 50% de los ratones a los 3 meses	Déficit en la memoria espacial	Lovasic y cols., 2005
APP (Sueca- Londres)	hAPP (K670N, M671L, V717I Sueca, Londres)	Depósitos de amiloide desarrollados a los 3 meses en el córtex, a los 5-7 meses en el hipocampo, tálamo y corteza olfativa.	No descrito	Rockenstein y cols., 2001.
Tg2576 x PS1	hAPP (K670N, M671L, V717I Sueca); hPS1(M146L)	Fuerte desarrollo de depósitos de A β en el córtex y hipocampo comparado con los Tg2576 así como una moderada secreción de A β 42.	Déficit en la memoria espacial	Holcomb y cols., 1998
3x Tg-EA	hAPP (K670N, M671L, V717I Sueca); hTau(P301L) hPS1(A246E, knock-in)	Producción dependiente de la edad de A β 40 y 42. Deposición de amiloide extracelular e intraneuronal a los 6-8 meses. Incremento progresivo de la patología de Tau.	Déficit en la retención, no se observó problemas en la adquisición. Déficit de memoria corregido por inyección intracraneal de A β .	Billings y cols., 2005

Tabla II (continuación)

Nombre	Transgen	Neuropatología	Comportamiento	Referencias
Ratones Tau				
Ishihara y cols 1999	3R 0N WT Tau humana	Inclusiones de Tau interneuronal, Tau insoluble y gliosis. Transporte axonal reducido.	Déficit motor y debilidad muscular	Ishihara y cols., 1999
Probst y cols 2000	4R 2N WT Tau humana	Patología de Tau progresiva, degeneración axonal y neuronal.	Déficit motor y debilidad muscular	Probst y cols., 2000
JNPL3	4R 0N P301L Tau humana	Aparición Tau hiperfosforilada y cuerpos de pick en el SNC. Tau inmunoreactiva en el córtex, hipocampo y la glía basal. Gliosis reactiva. Degeneración axonal y atrofia muscular esquelética.	Déficit motor y debilidad muscular. Bajo peso corporal. Pérdida de reflejos.	Lewis y cols., 2000
VLW	4R 2N G272V, P301L y R406W Tau	Alta expresión en el SNC e hipocampos. Filamentos e hiperfosforilación de Tau. Anormalidad lisosomal actividad fosfatasa incrementada.	No descritos	Lim y cols., 2001
Tg2576 x JNPL3	Ver arriba	Aumento de filamentos de Tau en el sistema límbico y córtex olfativo de los 9 a 11 meses y comparable estructura y número de placas amiloides con ratones Tg2576.	Debilidad motora progresiva	Lewis y cols., 2001
Tg2576 x VLW	Ver arriba	Incremento edad-dependiente de la fosforilación de Tau insoluble en el córtex entorrinal e hipocampo. Aumento de la deposición de amiloide comparado con ratones Tg2576.	Déficit de memoria moderado a los 6 meses y parecido al observado en ratones Tg2576 a los 16 meses.	Ribe y cols., 2005
Tg4510	4R 0N P301L Tau	Hiperfosforilación y filamentos de Tau. Pérdida neuronal y atrofia cerebral	Déficit de memoria a los 2-4 meses.	Podlisny y cols., 1995

APP: proteína precursora de amiloide, PS1: presenilina 1, 2,"N": Indica número de repeticiones del N-terminal,"R": las repeticiones de lugares de unión a microtúbulos encontradas enC-terminal.

Los modelos de ratón han sido muy útiles para reproducir el fenotipo patológico de amiloide y la patología de Tau y, en menor grado, para el déficit sináptico y la neurodegeneración usando una gran variedad de mutantes APP, presenilinas o proteínas Tau. A pesar de estos paralelismos con la enfermedad humana, ninguno de estos modelos han mostrado los típicos ovillos neurofibrilares ni sufren una pérdida significativa de cuerpos neuronales (Hock y Lamb, 2001). Aunque estos estudios han ayudado a comprender la función de algunos genes en el desarrollo de la EA y han servido para estudiar el papel del A β , para evaluar los efectos de numerosas aproximaciones terapéuticas incluyendo γ -secretasas (Ohno, 2006), agonistas muscarínicos (Fisher y cols., 2003),

inhibidores de BACE, inmunoterapia de A β y vacunas (Morgan y cols., 2000; Janus y cols., 2000), aún no existe un modelo que desarrolle fielmente todas las alteraciones propias de la patología. Idealmente se buscan animales que desarrollen todos los síntomas típicos de la EA, lo cual sería muy valioso para establecer un orden y una jerarquía en las alteraciones, saber cual es causa o consecuencia de otras, además de permitir estudiar la enfermedad desde su inicio, y poder probar nuevas terapias, comprobando sus efectos en cada fase de la patología. En este sentido, es importante destacar el último trabajo del laboratorio de Herrup, donde, basándose en que alteraciones en el ciclo celular dan lugar a la pérdida neuronal y en el alto grado de neuronas positivas para el ciclo en el cerebro de pacientes con EA, han observado que la aparición temporal y espacial de eventos del ciclo celular en ratón es muy parecida a la progresión de la enfermedad humana. Ellos proponen que, en modelos murinos de EA, la reentrada de las neuronas en ciclo celular ocurre antes de la aparición de las placas de A β o de procesos inflamatorios. Y que la prolongación en el tiempo entre la iniciación del ciclo celular y la muerte neuronal sugiere que, *in vivo*, hay otros procesos que pueden estar involucrados en el proceso de muerte (Yang y Herrup, 2006).

También han sido muy útiles los modelos celulares consistentes en líneas establecidas neuronales o extraneurales, así como cultivos primarios de neuronas y astrocitos, fundamentalmente de roedores, que sobreexpresan las mutantes humanas de los genes APP, PS1 y PS2 que son causa de EA (Mattson, 1997; Mattson y cols., 2001). Una estrategia alternativa y complementaria es el uso de tejidos periféricos de pacientes de EA. Numerosas evidencias experimentales hacen pensar que la EA, entre otras enfermedades del sistema nervioso, tiene también manifestaciones sistémicas, aunque con menores repercusiones clínicas (Nagy y cols., 2002; Gibson y Huang, 2002; Eckert y cols., 1994). Las células periféricas pueden tener gran relevancia, dado su fácil accesibilidad. De hecho se están utilizando células periféricas de pacientes con EA, como células sanguíneas (linfocitos y plaquetas) y fibroblastos (revisado por Echeberrygaray e Ibarreta, 2001). Aunque las células sanguíneas, al contrario que los fibroblastos, son susceptibles a influencias significativas y agudas de factores ambientales y del estado general del donante (Janus y cols., 2000) han sido utilizadas en el diagnóstico y pronóstico de enfermedades neurológicas (Kalman y cols., 2005, Tang y cols., 2004), apoyán-

dose en la comunicación existente entre el sistema nervioso central y el sistema inmunológico a través de múltiples mecanismos hormonales, moleculares y de neurotransmisores (Gladkevich y cols., 2004). En linfocitos de pacientes con EA se han observado fenómenos que ocurren en el cerebro de individuos con EA como la anormal expresión de APP (Li y cols., 1999), alteraciones en los niveles de enzimas antioxidantes (Meccoci y cols., 2002), daño oxidativo en el ADN, ARN y proteínas (Nijhuis y cols., 1996), regulación anómala del ciclo celular (Nagy y cols., 2002) y baja regulación de fosfatas implicadas en la hiperfosforilación de Tau (Maes y cols., 2006). Otras alteraciones que también se han descrito en plaquetas se encuentran en los canales de K^+ (Bondy y cols., 1996; De Silva y cols., 1998) y en la concentración de Ca^{2+} intracelular (Adunsky y cols., 1991; Le y cols., 1993). Estas alteraciones apoyan la idea del grupo de Percy que definen a las células sanguíneas como una “ventana” del sistema nervioso central (Percy y cols., 2000).

No hay que olvidar el uso de cultivos de fibroblastos, ya que, muestran numerosas anormalidades en procesos metabólicos y bioquímicos que son espejo de eventos que ocurren en el cerebro de EA (Gasparini y cols., 1998, Govoni y cols., 1996). Por ejemplo, en fibroblastos de EA, se han encontrado cambios que ocurren en sistemas de transducción de señal (Zhao y cols., 2002), incluyendo canales iónicos, AMP cíclico y la cascada de fosfatidilinosítidos, así como también en la regulación de la proteína β -amiloide (Gibson y cols., 1996; Palotas y cols., 2001 y 2002). Algunos de estos cambios tales como alteraciones en la fosforilación de ERK1, 2 parecen ser específicos de la EA, ya que, estas alteraciones no se encontraron en pacientes con la enfermedad de Huntington los cuales también presentan demencia (Zhao y cols., 2002). Además, presentan actividad anormal de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Mazzola y cols., 2003) y dañada la regulación del receptor Bradiquinina B2 por ester de forbol (Jong y cols., 2002). Finalmente, recientes evidencias halladas en el laboratorio de Uberti y cols., 2006 han demostrado alteraciones en la vía de señalización p53 que se acompañan de una menor vulnerabilidad de los fibroblastos de EA a la muerte celular por apoptosis (Uberti y cols., 2002).

Por ello, la utilización de tejidos periféricos puede ser de gran utilidad en neurología. El uso de células extraneuronales ofrece ventajas comunes a otros modelos celu-

lares y además permite la posibilidad de estudiar procesos patológicos en cualquier nivel de progresión. La utilización de tejidos extraneurales de pacientes con Alzheimer ha permitido la identificación de un buen número de alteraciones celulares y moleculares que son reflejos de fenómenos comparables en el cerebro de individuos afectados.

Objetivos de la tesis y planteamiento experimental

En términos generales, el objetivo de este trabajo ha sido el estudio, en células extraneurales de pacientes de EA, de alteraciones en los mecanismos de transducción de señales asociados con los procesos de supervivencia/muerte celular.

La EA, entre otras enfermedades del sistema nervioso, tiene también manifestaciones sistémicas, si bien con menores repercusiones clínicas (Nagy y cols., 2002; Gibson y Huang, 2002; Eckert y cols., 1994). Por ello se han utilizado tejidos periféricos de pacientes para el estudio de ciertos aspectos de la patología (Li y cols., 2004; Nagy y cols., 2002; Oliver y cols., 2006). El uso de células extraneurales ha permitido importantes avances en el conocimiento de procesos como la generación de β -amiloide o el papel de las presenilinas (Gibson y cols., 1996; Palotas y cols., 2001 y 2002).

En trabajos previos de nuestro laboratorio, realizados en linfocitos inmortalizados de pacientes de EA de aparición tardía, y donantes controles de edad aproximada, se pudo detectar alteraciones en la homeostasis de Ca^{2+} y de H^+ (Ibarretay cols. 1997, 1998) que se asociaron a una mayor respuesta proliferativa de las células de pacientes de EA (Urcelay y cols. 2001). Asimismo, otros grupos de investigación han demostrado fallos en la progresión a través del ciclo celular de linfocitos o de fibroblastos (Tatabayashi y cols., 1995; Etcheberrigaray e Ibarreta, 2001; Nagy y cols., 2002) de pacientes de EA. Además, parece que es posible detectar alteraciones en el ciclo celular en casos de pre-Alzheimer, es decir en individuos con Deterioro Cognitivo Leve (DCL) (Yang y cols., 2003). El interés de estas observaciones radica en que pueden considerarse reflejo de alteraciones de tipo “neoplásico” que se han detectado en cerebros de pacientes de EA (Arendt y cols., 1996; Yang y cols., 2001) y que ha llevado a algunos autores a postular la hipótesis de que alteraciones en los mecanismos de control del ciclo de división celular pudieran estar asociados con la muerte neuronal característica de la EA (Nagy y cols., 2000,2006; Copani y cols., 2002, Herrup, 2004).

Trabajos recientes de nuestro laboratorio, en los que se han estudiado algunos aspectos del control de la actividad proliferativa de pacientes de EA revelaron la existencia de una relación causal entre el estado de fosforilación de las proteínas de retinoblastoma y contenido celular de la proteína inhibidora de CDKs la p27^{kip1} . Asimismo, estos

trabajos pusieron de manifiesto la importancia de la cascada de señalización, dependiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ en la respuesta celular al suero, las células de pacientes de EA proliferan más activamente que las de individuos controles y son más resistentes a la muerte celular inducida por la retirada del suero (Cuevas y cols. 2003 y 2005). Ambos efectos son impedidos en presencia de antagonistas de CaM.

En base a estos antecedentes se propuso profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen en la mayor actividad proliferativa de linfoblastos de pacientes de EA.

Los objetivos concretos planteados para el desarrollo de esta tesis han sido los siguientes:

- 1. Estudio de los mecanismos de regulación del contenido celular p27^{kip1} en linfoblastos de pacientes de EA y donantes controles.**
- 2. Estudio de la interacción de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ con otras vías de señalización en la regulación de p27 y proliferación celular.**
- 3. Estudio del papel de la activación de $\text{PPAR}\gamma$ en el control de la actividad proliferativa.**

Este último objetivo se justifica si se tiene en cuenta que algunos estudios epidemiológicos sugieren que el tratamiento prolongado con antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) retrasa y atenúa los síntomas de EA. Estos efectos parecen estar más relacionados con la capacidad de AINEs de activar $\text{PPAR}\gamma$, que de inhibir las ciclooxigenasas. Dado que algunos activadores de $\text{PPAR}\gamma$ tienen potentes efectos antitumorales, se ha considerado la posibilidad de que la señalización a través de $\text{PPAR}\gamma$ pudiera reducir una supuesta presión mitótica en el cerebro de pacientes de EA, secundaria al proceso inflamatorio crónico.

En resumen, los objetivos de esta tesis se basan en la hipótesis de que alteraciones en los mecanismos de control del ciclo celular pudieran estar asociados con la muerte neuronal. Esta idea se apoya en la observación de niveles de expresión de ciertas proteínas reguladoras del ciclo celular significativamente distintos en biopsias

cerebrales postmortem de individuos sanos y afectados por la enfermedad de Alzheimer (Arendt y cols., 1996; McShea y cols., 1997; Nagy y cols., 1997; Busser y cols., 1998), así como en evidencias directas de que se produce replicación del material genético, en una fracción significativa de neuronas del hipocampo de estos enfermos, sin que este proceso ocurra en otras zonas cerebrales de los mismos sujetos no afectadas por la patología o en neuronas del hipocampo de individuos no dementes (Yang y cols., 2001).

Se propone estudiar los mecanismos de control del ciclo celular en linfoblastos de enfermos de Alzheimer y donantes controles de la misma edad. En base a la idea de que los procesos patológicos que afectan fundamentalmente al sistema nervioso tienen también una manifestación sistémica. De esta forma se intenta obviar las dificultades inherentes a la obtención de material de estudio procedente del sistema nervioso. Sin embargo, dado que los mecanismos reguladores del ciclo celular son más o menos ubicuos, la importancia de validar este modelo experimental radica no sólo en avanzar en el conocimiento de la etiopatogenia de la enfermedad de Alzheimer, sino también en la posibilidad de desarrollar sistemas simples de diagnóstico precoz de la enfermedad. La detección de alteraciones en la actividad proliferativa de células extraneurales, fácilmente accesibles pero que reflejan lo que ocurre en el sistema nervioso puede ayudar a identificar personas con riesgo de contraer la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica y establecimiento de líneas celulares linfoblásticas.

1.1. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.

La separación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), se realizó utilizando gradientes de densidad en Ficoll-Isopaque (LymphoprepTM 1077. Axix-Shield Po CAS, Oslo Noruega), según el procedimiento descrito por Seigneurin y cols., en el año 1988. El método permite la separación de células mononucleares que tienen una densidad inferior a la de los polimorfonucleares (granulocitos) y eritrocitos. La separación en un medio isosmótico de densidad igual a 1,077g/ml, permite que los eritrocitos y granulocitos sedimenten a través del medio y se forme una banda claramente visible con las células mononucleares entre la muestra y la interfase medio/muestra, como puede observarse en la figura 9. Se diluyeron 10 ml de sangre en un volumen de tampón fosfato salino (PBS) y se añadió 10-12 ml de medio de centrifugación (LymphoprepTM. Axix-Shield Po CAS, Oslo Norway), procurando no romper la interfase. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 1400 r.p.m durante 45 min sin freno. Se recolectó la fase que contiene los linfocitos eliminando los restos de LymphoprepTM (que resulta tóxico para las células) y de plaquetas con varios lavados con PBS. Las células aisladas se cultivaron en suspensión, a una concentración inicial de $1 \cdot 10^6$ células·ml⁻¹ en frascos de cultivo de 25 cm² en posición vertical, en medio RPMI-1640, que contenía L-glutamina 2 mM, 100 µg/ml de estreptomicina/penicilina, 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) y 5 µg/ml pokeweed (PWM) (Sigma-Aldrich Alcobendas, España), mitógeno específico de células B. Los cultivos se mantuvieron en un incubador húmedo, con 5% de CO₂ y 37° C.

El FBS, la penicilina, la estreptomicina y el medio de RPMI se adquirieron de GIBCO BRL (Gatithersburg, Maryland, USA).

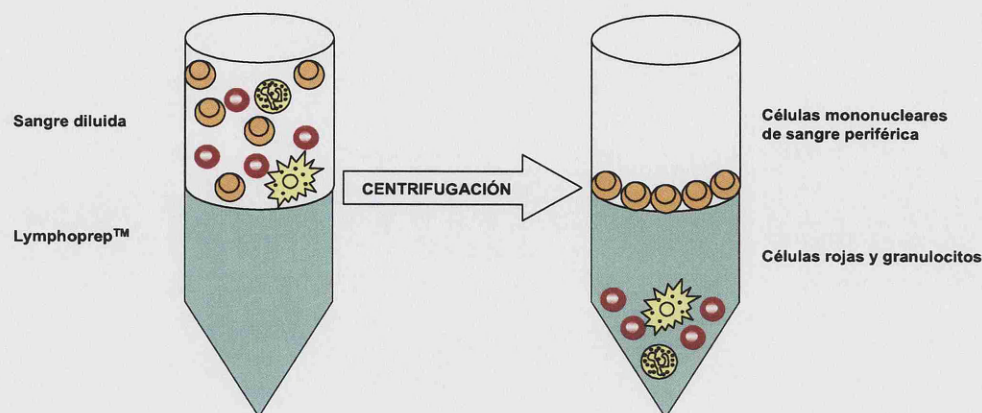


Figura 9. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.

1.2. Aislamiento de Linfocitos B.

Los linfocitos B se aislaron de la población de CMSP por selección positiva utilizando un sistema de bolas paramagnéticas unidas al anticuerpo monoclonal anti-CD19, marcador de superficie de células B (MACS Microbeads, Miltenyi Biotec, Berglisch Gladbach, Alemania) y columnas de separación magnéticas (MS Separation columns, Miltenyi Biotec, Berglisch Gladbach, Alemania), según las recomendaciones del producto. La población de CMSP procedente de 10 ml de sangre periférica, se resuspendió en PBS suplementado con 0,5% BSA y 2mM EDTA (pH 7,2) y se incubó con bolas paramagnéticas marcadas con anti-CD19 a una concentración de 20 μ l de bolas por cada 10^7 células, durante 15 minutos a 4°C. Pasado el tiempo de incubación, se recogieron las células, se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1400 r.p.m durante 10 min, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 500 μ l de PBS suplementado. Las células marcadas magnéticamente, se separaron de las no marcadas utilizando una columna de alto gradiente de separación magnética según se muestra esquemáticamente en la figura 10. El número de linfocitos B obtenidos fue alrededor de $1 \cdot 10^6$, los cuales fueron incubados en 1 ml de medio RPMI-1640, con L-glutamina 2 mM, 100 μ g/ml de estreptomicina/penicilina, 10% (v/v) de FBS y 5 μ g/ml de PWM.

1º paso: Incubación de las células con bolas paramagnéticas unidas a anti-CD19

2º paso: Pasar la mezcla tanto de células marcadas como sin marcar a través de columnas de alta afinidad magnética, unidas a un campo magnético, para eluir las células no marcadas.

3º paso: Quitar la columna del campo magnético y recoger las células marcadas positivamente.

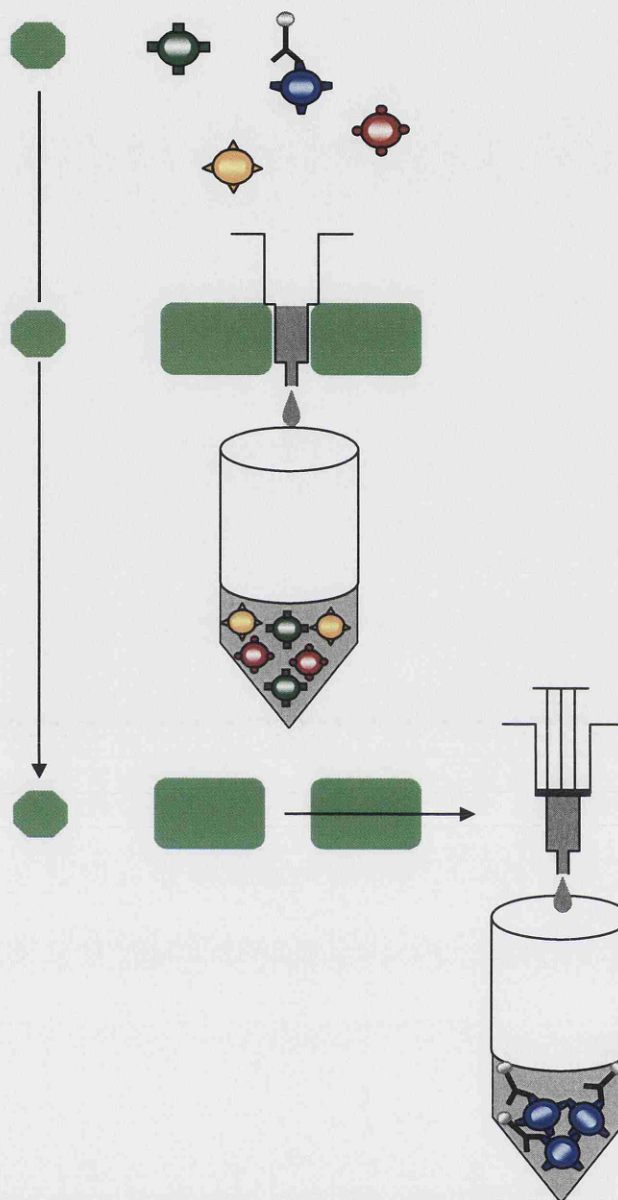
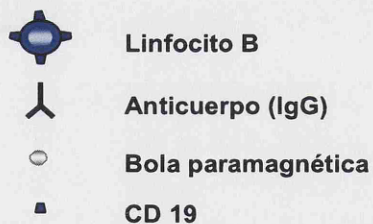


Figura 10. Selección positiva de linfocitos B.

1.3. Establecimiento de líneas celulares linfoblásticas.

El establecimiento de las líneas celulares linfoblásticas fue realizado en nuestro laboratorio por infección de linfocitos de sangre periférica con el virus de Epstein Barr (Koistinen, 1987).

1.3.1. Producción del virus Epstein-Barr.

El virus de Epstein-Barr utilizado en las transformaciones se obtuvo a partir de una línea celular de linfoma de Burkitt (B-95-6) cedida por Longina Akhtar (National Institute of Alcohol and Abuse Disorders, NIH, Bethesda, USA). En condiciones normales, un porcentaje de las células en cultivo sufre una infección lítica que libera el virus al medio. Se recolectó el sobrenadante del cultivo en monocapa de estas células y tras una centrifugación para eliminar restos celulares, se pasó a través de un filtro de 0,2 μm . El virus se conservó en alícuotas de 1 ml a -70°C para su posterior uso en las transformaciones linfoblásticas.

1.3.2. Transformación de linfocitos.

A la población de CMSP aisladas obtenidas como se describió anteriormente, se les añadió inicialmente una alícuota de 1 ml de virus de Epstein-Barr y 1 $\mu\text{g/ml}$ de ciclosporina para evitar la activación de los linfocitos T que podría impedir la proliferación inicial de los linfocitos B infectados, y se pusieron en cultivo. A partir de este momento se vigila el cultivo con cambios de medio una o dos veces por semana y en 3-4 semanas aparecen los primeros clones linfoblásticos. Una acidificación importante del medio constituye un excelente marcador de la transformación. Una vez transformadas las células se dividieron y se prepararon para su congelación, en el medio ya descrito, con un 7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO), para evitar rupturas celulares con la formación de hielo y se mantienen a -120°C en nitrógeno líquido en alícuotas de 1 ml. Tras la transformación, las células se crecieron en suspensión, en frascos de cultivo de 25 cm^2 en posición vertical, en aproximadamente 8 ml del medio RPMI-1640, que contenía L-glutamina 2 mM, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina y, a menos que se indique otra cosa, 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS). Los cultivos se mantuvieron en un incubador húmedo, con 5% de CO_2 y 37°C . El medio se cambió cada tres días aspirándolo sobre las células y sustituyéndolo por un volumen igual de medio fresco.

2. Métodos analíticos

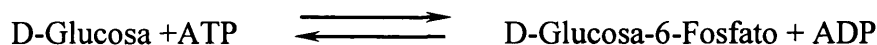
2.1. Determinación de intermediarios (glucosa y lactato)

Para el estudio metabólico, se sembraron las células a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6$ células \cdot ml⁻¹. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 1 ml. Las muestras se acidificaron inmediatamente con 6% de ácido perclórico frío. El precipitado se eliminó por centrifugación, y el sobrenadante se llevó a pH 6-7 con una solución de 3 N KOH y 0,5 M trietanolamina. El KClO₄ precipitado se eliminó por centrifugación a 13.000 g durante 5 min, y el sobrenadante se usó para hacer los ensayos metabólicos.

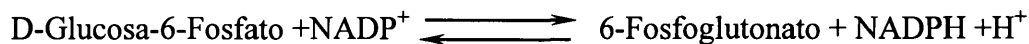
Los metabolitos se midieron espectrofotométricamente mediante reacciones que producen cambios en el estado de óxido-reducción del sistema de nucleótidos de nicotinamida. Todos los metabolitos se midieron mediante métodos previamente descritos (Bergmeyer, 1965).

2.1.1. Determinación de glucosa

El ensayo para la medida de glucosa se basa en 2 reacciones consecutivas. En la primera, la hexoquinasa cataliza la fosforilación de glucosa por ATP, en presencia de Mg²⁺:



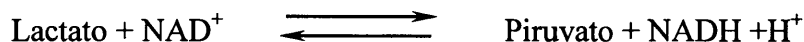
En la siguiente reacción la glucosa-6-P-deshidrogenasa cataliza la oxidación de la glucosa-6-fosfato por NADP⁺:



El equilibrio de esta reacción está desplazado completamente hacia la formación de NADPH, lo que produce un aumento de absorción a 340 nm que permite la valoración cuantitativa de la glucosa existente. El tampón usado en el ensayo contenía 50 mM trietanolamina pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 5 mM ATP y 6,5 mM NADP.

2.1.2. Determinación de lactato

La concentración de lactato se midió según la reacción que cataliza la enzima lactato deshidrogenasa, la oxidación de lactato, con NAD^+ como aceptor de hidrógeno:



Con exceso de NAD^+ o NADH se puede controlar el sentido de la reacción. Para la medición de lactato, tiene que haber exceso de NAD^+ , que desplace la reacción hacia la formación de piruvato. Además, al ser la reacción desfavorable en esa dirección, se utilizó un tampón alcalino para eliminar protones y desviar el equilibrio hacia la dirección que interesa. Este tampón contenía 0,5 M glicina, 0,4 M hidrazina pH 9,5 y 0,8 mM NAD^+ .

2.2. Análisis del ciclo celular

El análisis del ciclo celular se realizó mediante citometría de flujo, midiendo la incorporación de ioduro de propidio (IP) al ADN celular (Krishan, 1975). Para ello, se sembraron células a una concentración inicial de $1 \cdot 10^6$ células $\cdot \text{ml}^{-1}$, y se tomaron alícuotas a las 24, 48 y 72 horas después de inducir la proliferación. Las células se fijaron en etanol al 75% durante, al menos, 1h, a temperatura ambiente, y se almacenaron a 4°C, hasta que estuvieron procesadas todas las muestras. Antes del análisis, las células se centrifugaron y se incubaron en 0,5 ml de PBS con 1 µg/ml de ARNasa (Roche Mannheim, Alemania) y 1% de Nonidet P-40 (NP-40) durante 20 minutos, a temperatura ambiente. Finalmente, se tiñeron con 25 µg/ml de IP. La proporción de IP incorporado se midió en un citómetro de flujo EPICS-XL (Beckman Coulter, Florida, USA), utilizando una longitud de onda de excitación de 488 nm y recogiendo la emisión del IP a 620 nm. Los datos fueron analizados mediante el programa de ordenador Expo32 ADC (Beckman Coulter). Las distribuciones de las fases del ciclo celular se estimaron por el análisis computarizado de las distribuciones del contenido de ADN. La duración de la fase G_1 se estimó según lo descrito (Merrill, 1998).

2.3. Determinación de la proliferación celular.

Para determinar la tasa de proliferación celular se utilizó el kit de CYQUANT (Molecular Probes, Eugene, USA). Los linfoblastos inmortalizados de individuos controles y enfermos se sembraron a una concentración inicial de $1 \cdot 10^6$ células \cdot ml⁻¹. Las células se privaron del suero durante 24 horas. Al día siguiente se estimularon, añadiendo al medio un 10% de FBS. Se tomaron 200 μ l de muestra de cada cultivo cada 24 horas, se centrifugaron, y las células precipitadas se almacenaron a -70°C , hasta que estuvieron procesadas todas las muestras. Entonces se lisaron las células en el tampón de lisis del kit y se añadió otra solución que contenía el fluoróforo. La intensidad de la fluorescencia del ADN se midió en un fluorímetro de Perkin Elmer con un lector del microplacas, excitando a 485 nm y midiendo la emisión a 530 nm. Para la curva estándar, se estableció la línea base en el rango de 500 a 20000 células por pocillo.

El ensayo de reducción de MTT, fue otra técnica utilizada en esta tesis para medir la proliferación celular. Este ensayo se basa en la capacidad de las mitocondrias funcionalmente activas para convertir el MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide) en formazán, cuya cantidad es directamente proporcional al número células vivas. La determinación de la proliferación celular en las distintas condiciones experimentales se realizó incubando las células con 1 mg/ml de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) en un volumen de reacción de 200 μ l. Tras 2 horas de incubación las células se centrifugaron, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 200 μ l de DMSO para disolver los cristales de formazán. La absorbancia se midió a 570 nm con 630 nm como longitud de onda de referencia, en un espectrofotómetro Labsystems iEMS Reader MF.

También se estudió la proliferación, mediante recuento celular de los cultivos en un hemocitómetro de Neubauer diluyendo la muestra según la densidad del cultivo, y añadiendo azul de Tripán, un colorante vital que permite distinguir las células vivas de las células no viables.

2.4. Determinación de apoptosis celular

Para la detección de apoptosis se usaron dos métodos alternativos:

2.4.1. Incorporación de Ioduro de Propidio:

Por citometría de flujo se determinó la cantidad de células que se encontraban en la zona sub G₁ del ciclo, correspondiente a células apoptóticas.

2.4.2. Inclusión/exposición de Ioduro de Propidio y fosfatidilserina:

Se utilizó un kit de Pharmigen (San Diego, USA). Utilizando como marcadores la Anexina V y el IP se detectan células apoptóticas y necróticas (Anthony y cols., 1998). La Anexina V se une a la fosfatidilserina que en células viables se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática, y sólo se expone en células apoptóticas. El IP es un colorante vital, sólo entra en células que presentan la membrana dañada. Se analizó la exposición de fosfatidilserina al medio extracelular y la exclusión de IP tras teñir las células con Anexina V-fluoresceína e IP.

2.5. Inmunodetección y EMSA

2.5.1. Preparación de extractos celulares y nucleares

Para la obtención de extractos celulares se lavaron las células recogidas con PBS en frío, y luego se lisaron durante 20 minutos en hielo, en tampón de lisis (50mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1% Nonidet P-40) al cual se le añadió ortovanadato sódico 1 mM, PMSF 1 mM, pirofosfato sódico 1 mM y una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete Mini Mixture, Roche Mannheim, Alemania). Tras una centrifugación, para eliminar los restos de membranas (precipitado), se guardaron los extractos celulares a -80° C.

Para la obtención de extractos nucleares y citosólicos, se lavaron las células con PBS en frío, y luego se lisaron en un tampón de lisis A (10 mM Hepes pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM ortovanadato sódico, 0,1 M PMSF, y una mezcla de inhibidores de proteasas). Tras la extracción en hielo durante 15 minutos, se añadió 0,5 % NP-40 y se centrifugaron las células lisadas a 15.000 rpm

durante 5 minutos a 4° C. El sobrenadante, con las proteínas citosólicas, se volvió a centrifugar a 15.000 rpm durante 20 minutos, para extraer restos de membranas y se guardó a -80°C. El precipitado, con los núcleos de las células, se resuspendió en 50 µl de un tampón de lisis B (20 mM Hepes, pH 7,9, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,1 M PMSF y mezcla de inhibidores de proteasas). Tras la extracción en hielo y agitación durante 20 minutos, las muestras se centrifugaron a 15.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante, que contenía las proteínas nucleares, se almacenó a -80°C.

La concentración de proteínas totales en cada muestra, en todos los casos, se determinó con el kit de análisis de proteínas Bio-Rad (Hercules, USA).

2.5.2. Western Blotting

Los geles separadores y concentradores utilizados fueron del 7,5% o 12% y 4% de poliacrilamida, respectivamente. Se cargaron 20-100 µg de proteína total de cada extracto mezclada con tampón de carga (Tris-HCl 100 mM, pH 7.4, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2%, β-mercaptoetanol 5% y glicerol 20%), la mezcla se calentó a 90°C durante 10 minutos. En uno de los carriles se cargó un estándar de peso molecular. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 100 voltios y el tiempo varió en función de la proteína a determinar. Una vez separadas las proteínas se transfirieron a una membrana de Poly vinylidene fluoride (PVDF) (Immobilon-P) de Biorad. La cantidad de proteína y la calidad de la transferencia se verificaron tiñendo la membrana con una solución de Ponceau (Ponceau 0,1%, Sigma, acético glacial 5%, Merck) durante unos segundos y después se lavó con TBST (Tween 20 0,05% en TBS). La membrana se bloqueó en una solución de TBST/BSA (BSA al 1% en TBST) durante una hora a temperatura ambiente y luego se incubó con el anticuerpo primario correspondiente, a la concentración indicada en la tabla III, diluido en la misma solución de bloqueo, durante la noche a 4°C en agitación. Después, la membrana se lavó 3 veces con TBST durante 10 minutos, y para amplificar la señal del anticuerpo primario se incubó con un anticuerpo secundario específico para cada especie conjugado con peroxidasa, a la concentración indicada en la tabla IV, disuelto en una solución TBST / leche (leche desnatada al 5% en TBST) durante una hora. Tras lavar 3 veces con TBST durante 10

minutos, se reveló con el sistema detección de sustrato quimioluminiscente, ECL, (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra). Posteriormente la membrana se lavó con TBST y se trató con un tampón de “stripping” (Pierce, Rockford, USA) durante 20 minutos a 60°C para eliminar el anticuerpo primario y secundario, y a continuación se expuso a un nuevo anticuerpo primario. La cuantificación de las bandas se realizó mediante el estudio densitométrico de los autorradiogramas con un densitómetro GS-800 y el programa Quantity One 4.3.1 de BioRad.

Tabla III.- Anticuerpos primarios utilizados.

Anticuerpo	Dilución	Especie de origen	Casa comercial
anti-pRb (sc-500)	1:500	policlonal de conejo	Santa Cruz (Madrid, España)
anti-p130 (sc-317)	1:500	policlonal de conejo	Santa Cruz (Madrid, España)
anti-ciclina E (sc-198)	1:500	policlonal de conejo	Santa Cruz (Madrid, España)
anti-CDK2 (sc-748)	1:500	policlonal de conejo	Santa Cruz (Madrid, España)
anti-p27 (sc-528)	1:500	policlonal de conejo	Santa Cruz (Madrid, España)
anti-fosfo-p27 (Thr187)(sc- 16324)	1:250	policlonal de conejo	Santa Cruz (Madrid, España)
anti-p27	1:1000	monoclonal de ratón	BD Transduction Laboratories (Erembodegem, Belgica)
anti-ubiquitin (sc-913)	1:1000	policlonal de conejo	Santa Cruz (Madrid, España)
anti-fosfo-Akt (serina473)	1:2000	policlonal de conejo	Cell Signaling (Beberly, Massachussets)
anti-Akt (c-20)	1:2000	policlonal de cabra	Santa Cruz (Madrid, España)
anti-p44/p42 MAPK	1:2000	policlonal de conejo	Cell Signaling (Beberly, Massachussets)
anti-fosfo-p44/p42 MAPK	1:500	policlonal de conejo	Cell Signaling (Beberly, Massachussets)
anti-β- actina (A 2066)	1:2000	policlonal de conejo	Sigma Aldrich (Alcobendas, España)

Tabla IV.- Anticuerpos secundarios utilizados.

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial
Anti-IgG de cabra (IgG-HRP)	1:5000	Santa Cruz (Madrid, España)
Anti-IgG de ratón (IgG-HRP)	1:5000	Biorad (Hercules, USA)
Anti-IgG de conejo (IgG-HRP)	1:5000	Biorad (Hercules, USA)

2.5.3. Inmunoprecipitación y ensayo de la actividad quinasa del complejo ciclina E/CDK2.

Para determinar la actividad quinasa del complejo ciclina E/CDK2, los linfoblastos inmortalizados de individuos controles y de enfermos se sembraron a una concentración inicial de $1 \cdot 10^6$ células·ml⁻¹. Las células se privaron de suero durante 24 horas. Al día siguiente, se estimularon, añadiendo al medio, FBS, al 10% y se incubaron durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se realizaron extractos celulares (500µg) que fueron incubados con un anticuerpo contra ciclina E durante 2 horas a 4 °C en noria, seguido de la incubación con 20 µl de proteína G sefarosa durante 2 horas. Las muestras fueron lavadas posteriormente en tampón quinasa (50mM KCl, 8 mM MgCl₂, 1mM DTT, 3mM ATP, 50 mM Hepes, pH 7.4). Los inmunocomplejos fueron resuspendidos en 40 µl de tampón quinasa al cual se le añadió previamente histona H1 (0.2 µg/µl), que fue utilizada como sustrato y [γ^{32} P] ATP (10µCi). Después de una hora en agitación a 37°C, la reacción se paró mediante la adicción de 10µl de tampón 6X SDS. Después de hervir las muestras, se resolvieron en un gel de electroforesis al 12% SDS-poliacrilamida y la histona H1 fosforilada fue visualizada por autoradiografía. Las cantidades de histona H1 se detectaron mediante tinción del gel con Comassie.

2.5.4. Inmunolocalización de p27

Las células cultivadas a una densidad de $1 \cdot 10^6$ células·ml⁻¹ procedentes de individuos controles y enfermos de EA se recogieron y se lavaron dos veces con PBS (Roche) y se fijaron con una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato (PB) sódico 0,1 M, pH 7,4, durante 1 hora, a 4°C.

Una vez fijadas, las células se centrifugaron a 4°C durante 10 min a 1000 rpm y se lavaron dos veces en una solución PBS/BSA (3mg/ml de BSA en PBS). Las células (aproximadamente 10.000 células en 100µl de solución PBS/BSA) se dispusieron en portas tratados con polilisina (Fisher Biotech) utilizando una citocentrífuga (Shandon Cytospin®). Las células se incubaron con una solución de permeabilización y bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Esta solución contenía 0,1% Tritón X-100 (Fluka), 10% suero, 1% PBS. El suero bloqueante utilizado fue, generalmente, homoespecie del anticuerpo secundario. Posteriormente, se añadió el anticuerpo primario en una solución de la misma composición que la anterior y se dejó incubando a 4 °C durante 18-20 horas. El anticuerpo primario utilizado fue el siguiente: anti-p27 (policlonal de conejo, 1:50).

Transcurrida la incubación, se retiró la solución con el anticuerpo primario y las células fueron lavadas tres veces con PBS. Después, se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en la misma solución que el primario, durante una hora a temperatura ambiente. El anticuerpo utilizado está conjugado con una molécula fluorescente, la fluoresceína, Alexa 488 (1:200 Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA; Cappel, Durham, NC; Molecular Probes). Finalmente, los cubres y portas se montaron con una solución de 4 diazabicio (2,2,2) octano (DABCO) al 2% en glicerol al 70% con 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) a 2 µg/ml (Vector Labs), con el fin de teñir los núcleos y mejorar así los recuentos celulares. Las muestras se analizaron en un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioskop).

2.5.5. Ensayos de movilidad electroforética (EMSA)

Los ensayos de retardo en gel de PPAR γ , se realizaron con extractos celulares, esencialmente como se ha descrito previamente (Lam y Watson, 1993), usando un oligonucleótido de doble hebra (5'-CAAACTAGGTCAAAGGTCA-3'), obtenido de Santa Cruz. Los oligos se marcaron con [γ^{32} P] ATP y la enzima Polinucleótido quinasa T4. Los extractos celulares (~50 µg de proteína total), se incubaron con 0,5 ng del oligonucleótido marcado (50000 cpm) en un tampón de unión (10 mM Tris (pH 7,5), 50 mM NaCl, 1mM Ditiotretitol, 1mM EDTA, 5% glicerol) y 1µg de poli dI-dC. Para los ensayos de competición se añadió un exceso de 100 veces de sonda sin marcar.

Las muestras incubadas se corrieron en un gel no desnaturizante del 5% de poliacrilamida en una electroforesis a 150 voltios durante 90 minutos. El gel se secó en vacío y se analizó la cantidad de complejos ADN-proteína por densitometría, con un Phosphor Imager FLA-3000, y los programas Image Reader FLA-3000 1.11 e Image Gauge 3.46 de Fujifilm.

Los compuestos radiactivos fueron suministrados por Amersham Biosciences, (Buckinghamshire, Inglaterra). La mayoría de los reactivos fueron de la mayor pureza disponible, obtenidos de Sigma-Aldrich.

2.6. Determinación de la actividad del proteasoma.

La actividad del proteasoma 26S, se puede determinar evaluando la capacidad de los extractos celulares de degradar un compuesto fluorogénico llamado succinil-Leu-Leu-Val-Tyr7-amino-4-metilcumarina (Dick y cols., 1997). La actividad quimiotripsina peptidasa del proteasoma se determinó en extractos celulares obtenidos de individuos controles y pacientes con EA. Para ello, se mezcló 10µg de proteína con 300µl de tampón recomendado para la reacción (20mM Hepes, 0,5 mM EDTA pH 8,0, 0,035% SDS), y 20 µM succinyl-Leu-Leu-Val-Try-7-amido-4-methylcoumarin (Calbiochem, Canada) la mezcla se incubó a 37°C durante 90 min. La hidrolisis del sustrato se midió midiendo la liberación de Try-7-amido-4-methylcoumarin usando fluorímetro de Perkin Elmer con un lector del microplacas, excitado a 370 nm y midiendo la emisión a 460 nm.

3. Análisis estadístico.

A menos que se especifique otra cosa, todos los datos representan la media \pm error estándar. El análisis estadístico fue realizado con el programa Data Desk® 4.0 para Macintosh. La significación estadística se estimó, cuando fue necesario, con el análisis de variación (ANOVA) para medidas repetidas y análisis "post hoc", o por prueba t de Student. Las diferencias se consideraron significativas en un nivel de $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Establecimiento de líneas linfoblásticas

1.1. Descripción de los individuos donantes de sangre

Para este estudio se utilizaron 20 pacientes (15 mujeres y 5 varones), diagnosticados de probable Alzheimer de aparición tardía, según los criterios de NINCDS-ADRDA, que se describen en la tabla V, y 4 pacientes (1 mujer y 3 varones) diagnosticados de demencia con cuerpos de Lewy (DCLw), según los criterios de diagnóstico de consenso que se describen en la tabla VI. Como control, se utilizó un grupo de 23 individuos sanos de edad comparable (13 mujeres y 10 varones) tanto en el caso de los EA como en el de los de DCLw, sin ningún síntoma clínico de demencia. Las edades, sexo y otras características de los individuos controles y pacientes de EA y de DCLw se muestran en las tablas VII, VIII y IX respectivamente.

El diagnóstico, selección y extracción de la sangre de los individuos controles no dementes y de los EA y de DCLw se llevó a cabo en el departamento de Neurología del Hospital Doce de Octubre de Madrid. En todos los casos, las muestras de sangre fueron obtenidas tras el consentimiento informado por escrito de los pacientes o de sus familiares (se adjunta modelo).

Consentimiento informado de cesión de muestra de sangre

Con la firma del presente documento, acepto que una muestra de mi sangre sea guardada en el banco de muestras de sangre y tejidos neurológicos del Hospital "12 de Octubre" de Madrid. Esta donación de mi sangre podrá ser utilizada ahora o en el futuro para la investigación médica (básica, clínica o epidemiológica) siguiendo la normativa del comité ético de dicho Hospital (acorde con la legislación española e internacional al respecto). Esta incluye la confidencialidad (anonimato) de los datos sobre mi muestra de sangre o tejido.

En el momento que desee puedo retirar tanto este consentimiento como mi muestra de sangre e, incluso, por mí mismo o por un representante designado por mí puedo conocer la situación de los estudios que se realicen con la muestra de mi sangre.

Si no manifestara mi deseo de conocer la investigación no seré informado de la misma a no ser que de ella se derive una utilidad clara para las enfermedades que yo padezca o mis familiares.

En Madrid, a de de 20.....

Nombre del donante:

Firma del donante

Firma de familiar o testigo
(Exigible en caso de deterioro cognitivo del donante)

Firma del médico o personal entrenado que realiza la extracción y que garantiza haber explicado los fines y riesgos de la extracción de sangre.

Tabla V.- Criterios de diagnóstico NINCDS-ADRDA para el diagnóstico de la EA.

CRITERIOS PARA DIAGNÓSTICO DE EA

A.- CRITERIOS PARA EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE POSIBLE EA:

1. Demencia con variaciones en su inicio, en la presentación o en el curso clínico inusuales en la EA, pero para la que no hay explicación alternativa.
2. En presencia de un trastorno secundario sistémico o cerebral capaz de producir demencia del enfermo.
3. Cuando existe un déficit gradual progresivo de las funciones cognitivas.

B.-CRITERIOS PARA EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE PROBABLE EA:

1. Déficit cognoscitivo demostrado mediante examen clínico y documentado con tests y escalas validados.
2. Déficit en dos o más áreas cognitivas (memoria, juicio, cálculo, etc.).
3. Empeoramiento PROGRESIVO de la memoria y de otras funciones cognitivas.
4. Ausencia de trastornos de la conciencia (delirium).
5. Inicio entre los 40 y 90 años.
6. Sin evidencia de otras enfermedades cerebrales o sistémicas que pudiesen justificar el cuadro.

Apoyan el diagnóstico de EA probable:

7. Presencia de afasia, apraxia, agnosia.
8. Alteración de patrones de conducta e incapacidad para realizar tareas cotidianas
9. Historia familiar.
10. Exámenes complementarios: examen de LCR normal, enlentecimiento inespecífico o anormalidad en el EEG, y signos de atrofia cerebral progresiva en estudios seriados de TAC cerebral.

C.- CRITERIOS PARA EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DEFINITIVO EA:

1. Cumplir los criterios clínicos de EA probable.
 2. Evidencias histopatológicas obtenidas por biopsia o necropsia.
-

MacKahn y col, 1984

Tabla VI.- Criterios de diagnósticos de consenso para el diagnóstico de DCLw.

CRITERIOS PARA DIAGNÓSTICO DE DCLw:

I.- CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS CENTRALES (Esencial para un diagnóstico posible o probable de DCLw):

Demencia progresiva.

1. La alteración de la memoria puede no ser evidente en las fases iniciales.
2. En general destacan las alteraciones de la atención y de las funciones frontosubcorticales y visuospaciales.

II.- CARACTERÍSTICAS ESENCIALES (Dos o tres de los siguientes aspectos sirven para diagnosticar demencia con cuerpos de Lewy probable. Un aspecto permite diagnosticar demencia con cuerpos de Lewy posible):

1. Fluctuaciones de las funciones cognitivas, con variaciones notables en el nivel de conciencia y grado de atención.
2. Alucinaciones visuales recurrentes, bien estructuradas, que perciben con gran detalle.
3. Signos motores espontáneos de parkinsonismo.
4. Trastorno conductual del sueño REM.
5. Disminución de transportadores de dopamina se estima una disminución cercana al 60% del contenido de dopamina en el estriado, demostrado por técnicas de neuroimagen con PET o SPECT.

III.- CARACTERÍSTICAS QUE APOYAN EL DIAGNÓSTICO:

1. Caídas repetidas
2. Sincopes
3. Pérdida de conciencia transitoria
4. Hipersensibilidad a los neurolépticos.
5. Alucinaciones no visuales.

IV.- CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS DE EXCLUSIÓN:

1. Enfermedad vascular cerebral, evidente a través de signos neurológicos focales o lesiones vasculares en pruebas de neuroimagen cerebral.
2. Evidencia en la exploración física o en las pruebas complementarias de otra enfermedad neurológica o sistémica que pueda ser causa del cuadro clínico.

Tabla VII.- Líneas celulares de controles sanos seleccionados para los experimentos.

Líneas	Edad	Sexo	Diagnóstico	Historial clínico
C-10	78	V	sano	
C-11	77	V	sano	
C-12	73	V	sano	
C-14	58	M	sano	
C-18	67	M	sano	
C-33	82	V	sano	enf. pulmonar
C-34	88	M	sano	anemia
C-36	79	M	sano	angor
C-37	57	M	sano	broncoespasmos
C-38	69	V	sano	enf. pulmonar
C-40	89	V	sano	
C-41	79	M	sano	fibrilación auricular
C-42	82	M	sano	infarto
C-43	46	M	sano	
C-46	68	V	sano	
C-47	80	V	sano	
C-48	42	M	sano	
C-49	81	M	sano	
C-50	77	M	sano	
C-51	86	V	sano	
C-105	54	M	sano	
C-107	58	V	sano	
C-111	43	M	sano	

Tabla VIII.-Líneas celulares linfoblásticas de enfermos de EA seleccionadas para los experimentos.

Líneas	Edad	Sexo	Años de evolución	Diagnóstico probable	Historia clínica adicional
AZ 10	81	M	1	TARDÍA	
AZ 12	78	M	1	TARDÍA	
AZ 13	86	M	2	TARDÍA	
AZ 23	82	V	3	TARDÍA	
AZ 24	74	V	2	TARDÍA	
AZ 25	79	M	5	TARDÍA	
AZ 27	91	V	1	TARDÍA	
AZ 32	79	M	1	TARDÍA	
AZ 33	72	V	3	TARDÍA	
AZ 34	82	M	3	TARDÍA	
AZ 36	74	M	6	TARDÍA	
AZ 40	74	M	2	TARDÍA	
AZ 42	69	V	0	TARDÍA	
AZ 43	69	M	3	TARDÍA	
AZ 46	74	M	4	TARDÍA	
AZ 54	79	M	2	TARDÍA	Hipertensión
AZ 66	83	M	4	TARDÍA	
AZ 67	80	M	5	TARDÍA	Hipertensión
AZ 71	74	M	6	TARDÍA	
AZ 73	84	M	4	TARDÍA	

Tabla IX.-Líneas celulares linfoblásticas de enfermos de DCLw seleccionadas para los experimentos

Líneas	Edad	Sexo	Diagnóstico	Historial clínico adicional
DCLw100	79	V	DCLw	
DCLw101	62	V	DCLw	
DCLw102	58	V	DCLw	
DCLw103	91	M	DCLw	

2. Actividad proliferativa de linfoblastos de donantes controles y pacientes con EA.

2.1. Efecto del suero sobre proliferación celular.

Estas líneas celulares han sido utilizadas previamente en nuestro laboratorio y caracterizadas funcionalmente. Los linfoblastos de EA presentan alteraciones en la homeostasis de Ca^{2+} y de H^+ (Ibarreta y cols., 1997, 1998), que se acompañan de una respuesta anómala a la presencia o ausencia de suero, observándose un aumento en la velocidad de proliferación celular (Cuevas y cols., 2003) tras la estimulación con suero, o una mayor resistencia a la muerte celular inducida por la ausencia de factores tróficos (Cuevas y cols., 2005).

El principal objetivo de esta tesis, ha sido estudiar los mecanismos moleculares implicados en el control de la proliferación celular en respuesta al suero. Por esta razón, se consideró importante determinar la dependencia de la respuesta celular a la concentración de suero utilizado en este estudio (lote # 1094941 de Gibco SL). Los resultados se muestran en la figura 11.

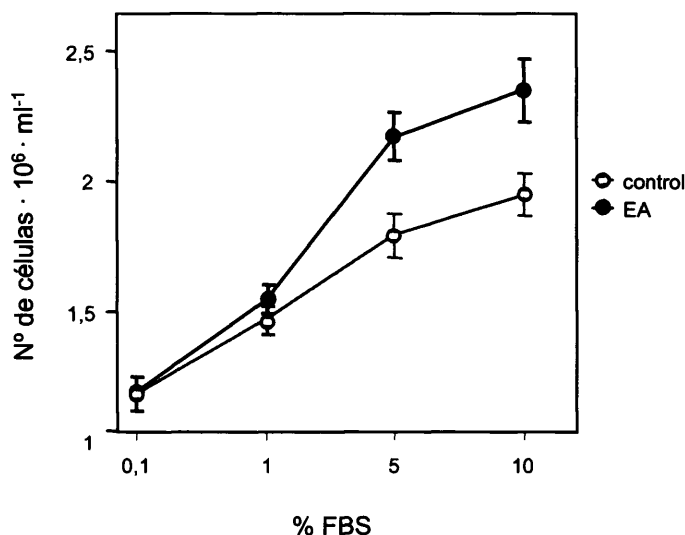


Figura 11.- Efecto del suero en la proliferación de individuos controles y de pacientes de EA. Dosis respuesta. Las células se sembraron en medio RPMI a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ en presencia de concentraciones crecientes de suero (FBS lote # 1094941 de Gibco). A las 72 h, se realizó un recuento de las células que excluyen azul de tripan en una cámara Neubauer. La gráfica muestra la proliferación de las células controles (símbolos huecos) y de enfermos de EA (símbolos sólidos). Los valores son la media \pm error estándar de 5 experimentos.

A partir de concentraciones de suero mayores del 1 %, se observa una mayor respuesta proliferativa en las líneas celulares procedentes de pacientes con EA.

2.2. Estudios de las vías de señalización celular implicadas en la respuesta proliferativa al suero.

La mayor respuesta proliferativa de las células derivadas de pacientes con EA podría ser causada por uno o más componentes del suero. Por ello, se intentó, en primer lugar, comparar la respuesta celular de las líneas linfoblásticas controles y de EA, a una serie de potenciales candidatos, factores de crecimiento, interleuquinas, o el péptido β -amiloide. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla X.

Tabla X.- Respuesta mitogénica de linfoblastos de individuos controles y de enfermos de Alzheimer.

	Control	EA
Tratamiento	Nº de células. $10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$	
Ninguno	1,46±0,08 (13)	1,47±0,1 (13)
IL-4 (50 ng/ml)	1,56±0,07 (6)	1,75±0,07 (6)
IL-1 β (10 ng/ml)	1,70±0,12 (6)	1,79±0,08 (6)
Anti α IgM (2 μ g/ml)	1,57±0,17 (4)	1,50±0,03 (4)
EGF (20 ng/ml)	1,53±0,16 (6)	1,62±0,13 (6)
aFGF (20 ng/ml)	1,51±0,02 (5)	1,46±0,06 (5)
bFGF (10 ng/ml)	1,61±0,20 (5)	1,72±0,11 (5)
PAF (0,1 μ M)	1,39±0,09 (4)	1,41±0,26 (4)
β -amiloide (1 μ M)	1,51±0,13(4)	1,65±0,03 (4)
10% FBS	1,97±0,18 (10)	2,87±0,17 (10) *

Los linfoblastos procedentes de individuos controles y de pacientes con EA se incubaron en medio RPMI conteniendo 1% de suero a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ y se mantuvieron en cultivo durante tres días en presencia de las concentraciones indicadas de interleuquinas, factores de crecimiento, o el péptido β -amiloide (fragmento 25-35). La actividad proliferativa se determinó por recuento directo en cámara de Neubauer. Los resultados son la media \pm error estándar del número de observaciones indicadas en paréntesis. * $p < 0,05$.

Como puede observarse, solamente se encontró una respuesta exacerbada, de las células de EA, a la presencia de 10% suero. En segundo lugar, se estudió la influencia de la perturbación de las principales vías de señalización celular en la respuesta proliferativa de linfoblastos controles y de EA. Para este fin, se utilizaron los siguientes inhibidores específicos: H-7, inhibidor de proteína quinasa C (PKC) (Kumahara y cols., 1999); genisteína para inhibir tirosina quinasas (Um y cols., 2002); antagonistas de calmodulina como calmidazolium (CMZ) y W7 (Zeng y Tulsiani, 2003); PD98059, inhibidor de ERK1/2 (Dudley y cols., 1995); Ly 294002, inhibidor de PI3-K/Akt (Yano

y cols., 1995) , así como toxina pertussis (PTX), para inhibir la señalización a través de proteínas $G_{i/o}$ (Gunter y cols., 2000) y el ligando de $PPAR\gamma$, 15d-PGJ₂ (Forman y cols., 1995). Los resultados aparecen recogidos en la Tabla XI.

Figura Xi.- influencia de la perturbación de distintas vías de señalización en la respuesta proliferativa de los linfoblastos de individuos controles y de enfermos de Alzheimer.

	Control	EA
Tratamiento	% de Inhibición	
PTX (0,2ng/ml)	31 ± 2	29 ± 3
H-7 (25 µM)	15 ± 5	19 ± 5
Genisteína (1µM)	26 ± 2	26 ± 2
CMZ (1µM)	4 ± 2	26 ± 2*
W-7 (1µM)	5 ± 3	29 ± 3*
15d-PGJ ₂ (2,5 µM)	4 ± 3	26 ± 2*
PD 98059 (20 µM)	2 ± 4	8 ± 5
Ly 294002 (20 µM)	35 ± 2,5	41 ± 5

Los linfoblastos procedentes de individuos controles y de pacientes con EA se incubaron en medio RPMI conteniendo 10% de suero a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ al día cero, y se mantuvieron en cultivo durante tres días en presencia de las concentraciones indicadas de los distintos inhibidores de proteínas quinasas o del ligando del receptor de $PPAR\gamma$. La actividad proliferativa se determinó por recuento directo en una cámara Neubauer. Los resultados son la media ± error estándar de, al menos 5 experimentos diferentes.* $p < 0,05$.

La inhibición de proliferación celular a los 3 días del tratamiento con H-7 o genisteína fue similar en células controles y de pacientes de EA. Asimismo, la toxina pertussis produce aproximadamente, un 30% de inhibición del crecimiento celular en ambos casos. Por tanto, y aunque parte de la estimulación inducida por el suero se deba a la activación de proteínas quinasas y a la estimulación de receptores acoplados a proteínas G, estos resultados no dan cuenta de la mayor respuesta proliferativa de los

linfoblastos de pacientes de EA. Por el contrario, la perturbación de la vía de señalización dependiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ mediante dos compuestos no relacionados estructuralmente, como son el CMZ y el W-7, produce únicamente la inhibición de la proliferación en linfoblastos de enfermos de EA, sin afectar a las células controles. Asimismo, la activación de $\text{PPAR}\gamma$ inhibe selectivamente el incremento de proliferación, de las células de EA en relación a las células control. Estos resultados sugieren la implicación de estas rutas en la mayor activación de proliferación, inducida por el suero, en linfoblastos de pacientes de EA.

2.3. Actividad proliferativa y metabólica de linfoblastos de individuos control y pacientes con EA.

La figura 12, muestra la cinética de crecimiento celular, en presencia de 10% de FBS, de cada una de las líneas celulares utilizadas. En la mayoría de los casos de pacientes con EA, se observa un aumento significativo desde las 24 horas, en la tasa de proliferación respecto a la de células de donantes controles. En la figura 13, se recogen los datos promedio de estos experimentos.

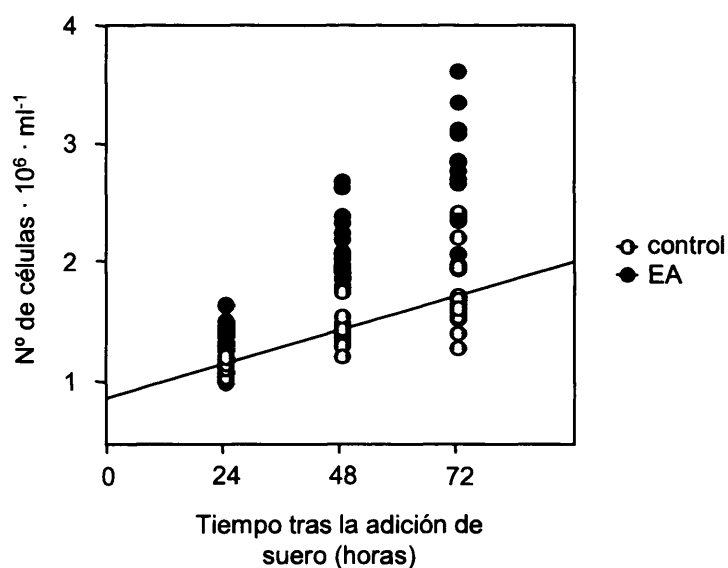


Figura 12.- Análisis pormenorizado de la velocidad de proliferación de cada una de las líneas linfoblásticas. Las células se sembraron en medio RPMI con 10% de suero a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$. A las 24, 48 y 72 h de la siembra se tomaron alícuotas y se hizo un recuento en cámara Neubauer de las células que excluían azul trypan. Cada punto en la figura representa un individuo. La línea continua representa el valor promedio de la tasa de proliferación de las células controles.

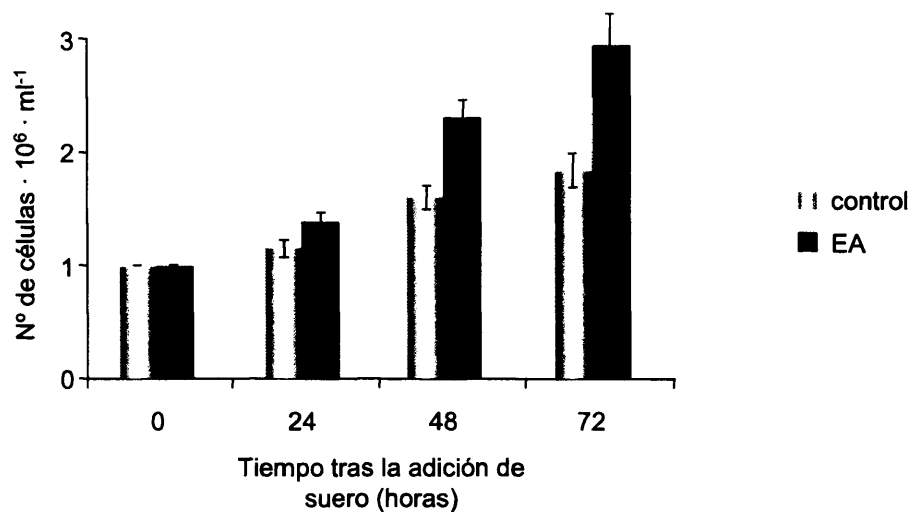


Figura 13.- Actividad proliferativa de linfoblastos derivados de donantes controles y pacientes con EA. Las condiciones experimentales son las mismas que en la figura 12.

La figura 14, muestra la tasa de utilización de glucosa y la de producción de lactato a medida que las células progresan a través del ciclo celular. No se observaron diferencias significativas en la tasa de utilización de glucosa o en la de producción de lactato. Ahora bien, teniendo en cuenta el aumento de proliferación celular en los cultivos de pacientes de EA, estos resultados sugieren una disminución en el metabolismo de glucosa en las células de pacientes de EA.

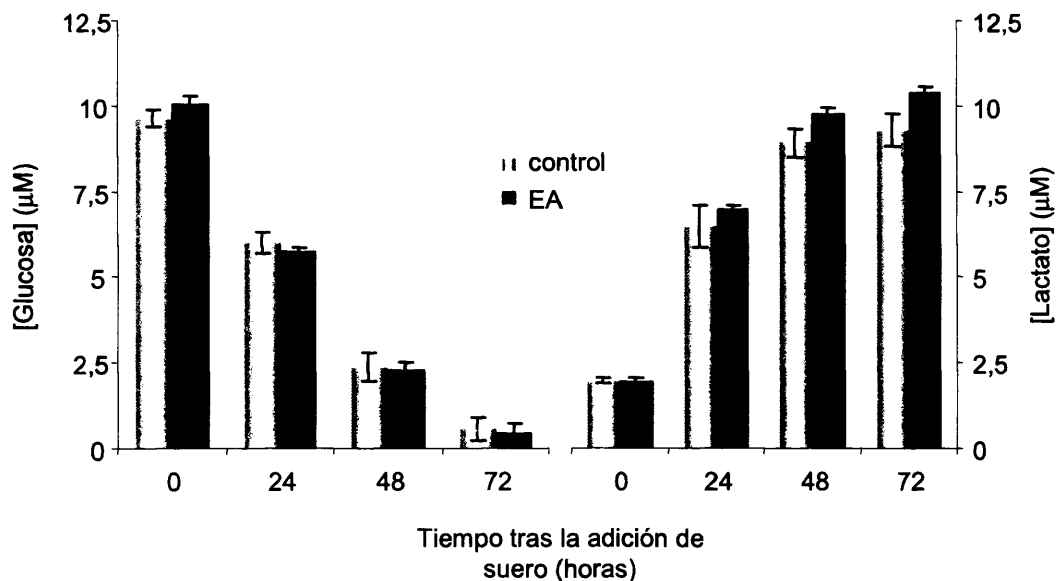


Figura 14.- Metabolismo celular en respuesta al suero en linfoblastos procedentes de individuos controles y EA. Los linfocitos procedentes de individuos controles y de EA se sembraron a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ y se incubaron en RPMI conteniendo 10% de suero. La concentración de glucosa y de lactato en el medio extracelular se determinó espectrofotométricamente según se describe en métodos. Los resultados representan la media \pm error estándar de 6 experimentos.

2.4. Actividad proliferativa de linfoblastos de individuos control y pacientes con DCLw.

Con objeto de ver si el aumento de proliferación en respuesta al suero de linfoblastos con EA es privativo de la EA o común con otras enfermedades neurodegenerativas se determinó la cinética de crecimiento celular, en presencia de 10% de FBS, de linfoblastos de individuos con DCLw con respecto a individuos controles de la misma edad, no observando cambios entre ambas líneas celulares como se muestra en la figura 15.

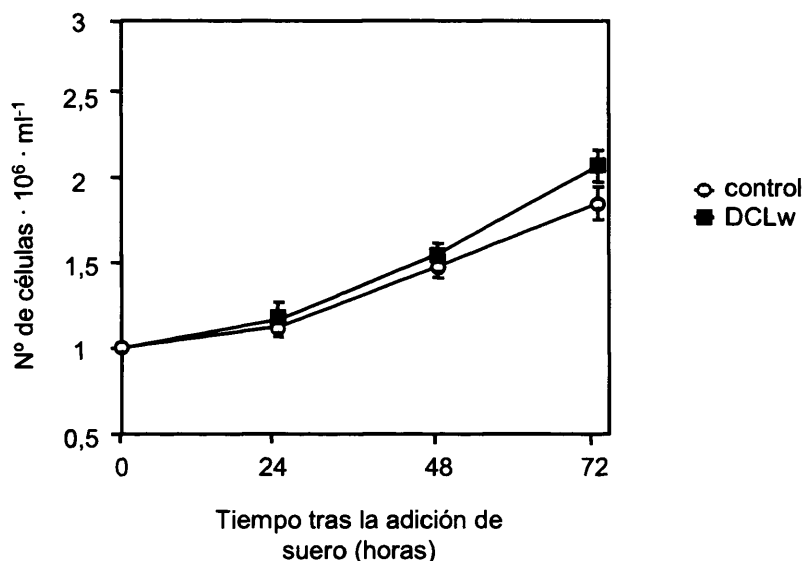


Figura 15.- Actividad proliferativa de linfoblastos derivados de donantes controles y pacientes con DCLw. Las células se sembraron en medio RPMI con 10% de suero a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$. A las 24, 48 y 72 h de la siembra se tomaron alícuotas y se hizo un recuento en cámara Neubauer de las células que excluían azul de trypan. Los resultados representan la media \pm error estándar de 4 experimentos independientes.

2.5. Expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular.

Trabajos previos de nuestro laboratorio, pusieron de manifiesto una perturbación en el tránsito entre las fases G_1 y S del ciclo celular (Cuevas y cols, 2003; Muñoz y cols. 2005) en linfoblastos de EA. En consonancia con estos trabajos, la figura 16 muestra cambios importantes en la expresión y fosforilación de la proteína de retinoblastoma (pRb) y de p130 en linfoblastos de pacientes de EA, en respuesta al suero. La función de estas proteínas es reprimir la activación de la familia de factores de transcripción E2F, cuyo papel es regular la expresión de genes clave para la progresión de las células

a través del ciclo celular. Las formas hipo e hiperfosforilada de estas proteínas se distinguen por su movilidad electroforética y técnicas de inmunoblotting, utilizando anticuerpos específicos. Ambas proteínas son fosforiladas en respuesta al suero, si bien con una temporalidad diferente. La fosforilación de la pRb es transitoria, alcanzando el máximo a las 24 h de la administración del suero (figura 16). Por el contrario, la fosforilación de p130 aumenta de forma progresiva a lo largo del tiempo. La comparación entre el grupo control y de pacientes con EA revela una mayor respuesta al suero en las líneas linfoblásticas derivadas de EA, aumentando tanto los niveles de expresión como la fosforilación de estas proteínas (figura 16).

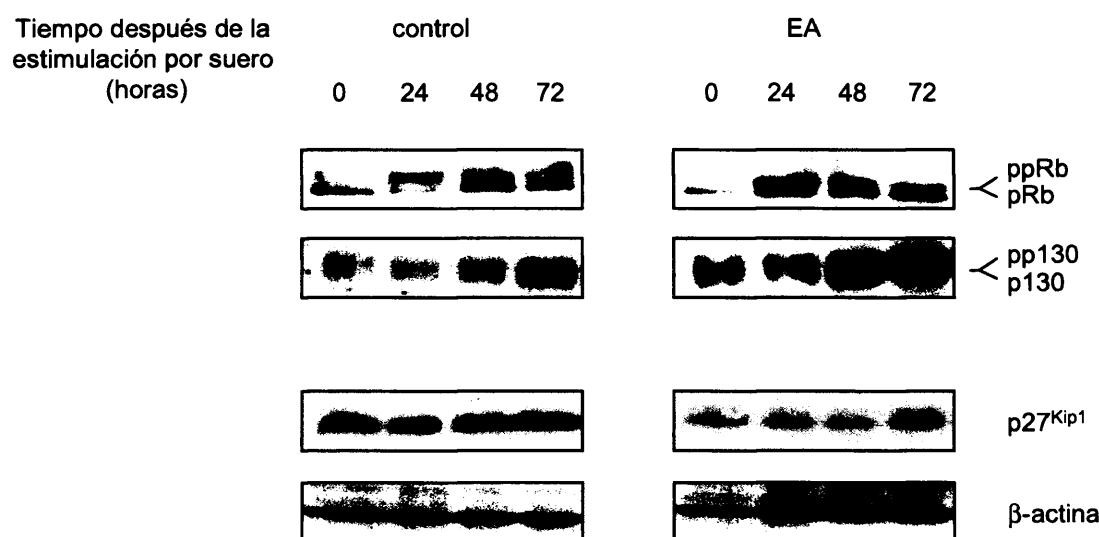


Figura 16.- Determinación de los niveles de expresión y estado de fosforilación de las proteínas de la familia de Rb y del CDKI, p27, en linfoblastos controles y con EA, activados por suero. Las células se sembraron a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ en medio RPMI, y se privaron de suero durante 24 h. Tras la estimulación con el 10% de suero, cada día se tomaron muestras del cultivo, las proteínas fueron separadas en geles desnaturalizantes, transferidas a una membrana e incubadas con un anticuerpo primario específico para cada proteína. Las proteínas inmunoreactivas fueron reveladas mediante una reacción de quimioluminiscencia. pp= forma fosforilada de la proteína correspondiente.

La fosforilación de las proteínas de la familia de retinoblastoma es mediada por la actividad de los complejos ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), fundamentalmente ciclina D1/CDK4,6 y ciclina E/CDK2 (Chen y cols. 1999). La actividad de estos complejos es regulada negativamente por la presencia de proteínas inhibidoras (CDKIs). Resultados previos de nuestro laboratorio, indicaron una disminución importante en el contenido celular de una de estas proteínas, la p27^{Kip1}

(p27) (Cuevas y cols., 2003, Muñoz y cols., 2005). En nuestras condiciones experimentales, también se observa una disminución en los niveles de esta proteína en las células de pacientes de EA (figura 16).

Uno de los principales objetivos de esta tesis, ha sido el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la regulación anómala de p27 en linfoblastos de pacientes de EA.

En primer lugar, se determinaron los niveles de p27 en cada una de las líneas celulares. Los resultados aparecen recogidos en la figura 17 donde puede observarse cómo en la mayoría de los casos, las células de pacientes muestran un menor contenido de p27 que las células de donantes controles, a las 24 h de la estimulación con suero.

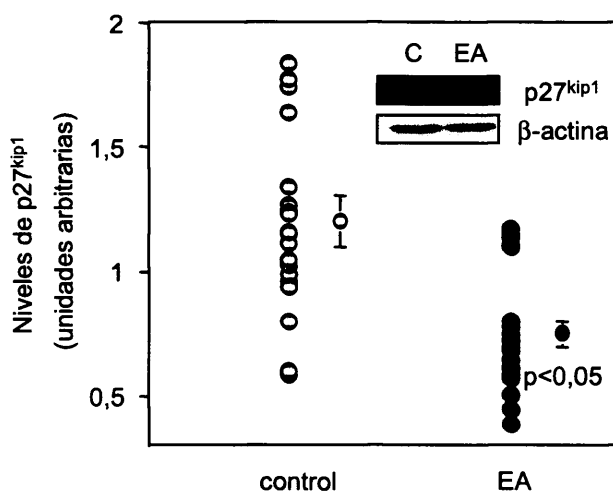


Figura 17.- Análisis pormenorizado de los niveles de expresión de p27^{kip1} en linfoblastos controles y de EA. Las células se sembraron como se indica en la figura 2. A las 24 h de la siembra se tomaron alícuotas para la preparación de extractos celulares. Los niveles de p27 se determinaron mediante western blot. Se muestra un experimento representativo en el interior de la figura, y ésta, representa la cuantificación densitométrica de los niveles de p27 en cada línea celular. A la derecha de los puntos correspondientes se muestra el valor promedio y el error estándar de la media (* p<0,05).

2.6. Estado del ciclo celular y niveles de p27 en CMSP y linfocitos B de individuos controles y pacientes con EA.

Para comprobar que las diferencias observadas entre linfoblastos procedentes de EA e individuos controles no están relacionadas con el proceso de inmortalización de estas líneas celulares, se estimularon CMSP con un mitógeno específico de linfocitos B, PWM, durante tres días y realizamos análisis del ciclo celular y medimos los niveles de p27. La figura 18 A, muestra que los linfocitos de pacientes con EA presentan una

mayor proporción de células en las fases S y G₂/M del ciclo celular que la observada en individuos controles, sugiriendo un incremento en la tasa de proliferación de estas células. Este efecto se asoció con una disminución en los niveles de p27, coincidiendo con lo observado en linfoblastos de EA. También observamos una disminución de los niveles de p27 en linfocitos B, aislados magnéticamente, de pacientes de EA tras la estimulación con PWM, como se muestra en la figura 18 B. Estos resultados justifican el uso de linfocitos inmortalizados para el estudio de aspectos moleculares y celulares de la patología de la EA.

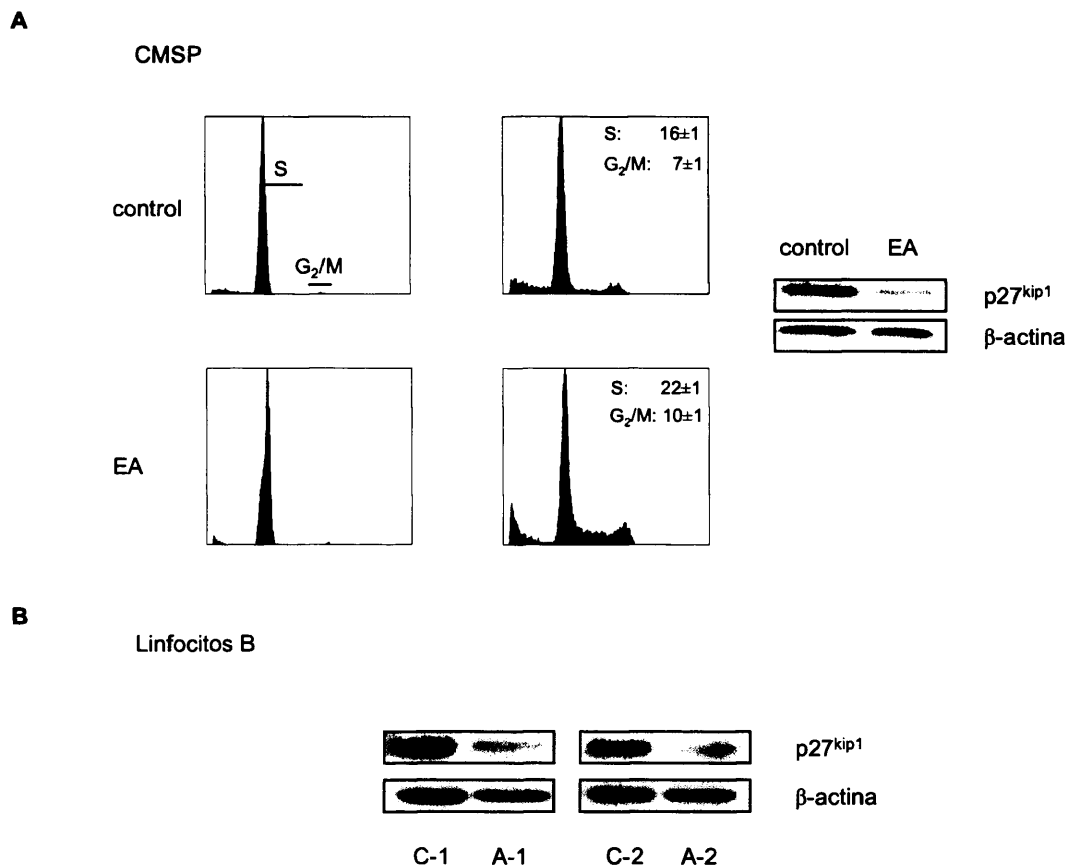


Figura 18.- Estado del ciclo celular y niveles de p27 en CMSP y linfocitos B de individuos controles y pacientes con EA. Panel A: Las CMSP de individuos controles y pacientes con EA se sembraron a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ en medio RPMI con 10% suero y 5 $\mu\text{g/ml}$ de PWM. A las 72 h, se tomaron alícuotas para determinar la distribución de células en fases S y G₂/M del ciclo celular. Para ello, se midió por citometría de flujo la incorporación de IP por los núcleos como se describe en los Métodos. Se muestran los porcentajes de células en las fases S y G₂/M del ciclo celular, obtenidos mediante análisis informático. Los resultados son la media \pm error estándar de 3 experimentos. A la derecha del panel A se muestra un inmunoblot de p27 de extractos obtenidos a las 72 h de la estimulación con 5 $\mu\text{g/ml}$ de PWM. Panel B: Los linfocitos B aislados como se describe en los Métodos, procedentes de 2 individuos controles y 2 pacientes de EA, se sembraron a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ en medio RPMI con 10% suero y se incubaron durante 24h con 5 $\mu\text{g/ml}$ de PWM. A las 24h se realizaron extractos totales para la detección de p27 por western blot.

3. Regulación del contenido celular de p27^{kip1}.

3.1. Determinación de la vida media de p27 en linfoblastos controles y de EA.

Para la determinación de la vida media de p27, se incubaron las células en presencia de cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de novo de proteínas y se determinó por western blotting la desaparición de la proteína pre-existente, a lo largo del tiempo. Como puede observarse en la figura 19, los niveles de p27 descienden mucho más rápidamente que en las células controles. La vida media de p27 se estimó en $22 \pm 1,3$ h y $12 \pm 0,4$ h en células control y de EA respectivamente.

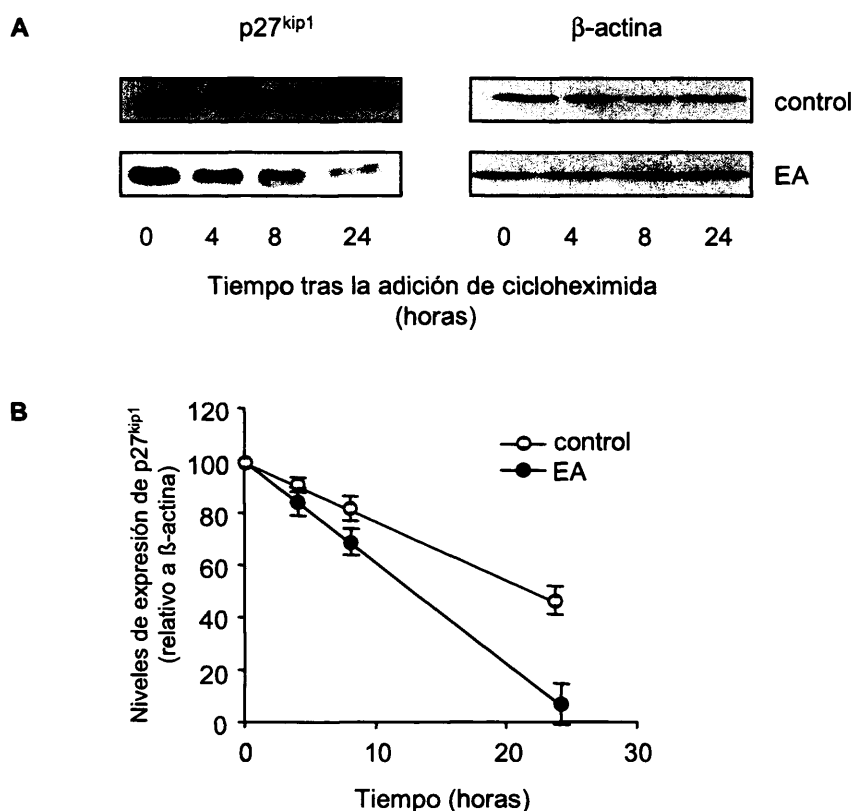


Figura 19.- Vida media de p27 en células de individuos controles y pacientes con EA. Las células se sembraron a una densidad inicial de $1.10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ y se incubaron en RPMI conteniendo 10% de suero. A las 24 h de la siembra, se añadió 10 $\mu\text{g/ml}$ de cicloheximida. Tras la adición del inhibidor, se recogieron muestras del cultivo a las 4, 8 y 24 h, con las que se determinaron los niveles de p27 mediante western blot, como se representa en el panel A. En el panel B, se muestra los resultados del análisis densitométrico de la desaparición de p27 en función del tiempo, en 4 experimentos independientes.

La alteración en la velocidad de degradación de p27 que se observa en los linfoblastos de pacientes con EA, parece ser específica de p27, pues como se puede apreciar en la figura 20, no se observó ningún cambio en la vida media de otra proteína del ciclo celular, como la ciclina E.

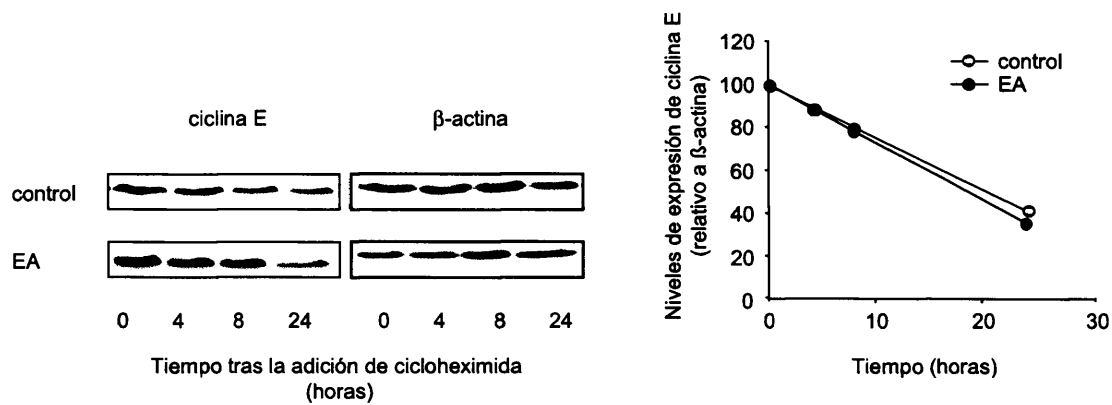


Figura 20.- Vida media de ciclina E en células de individuos controles y pacientes con EA. Las condiciones experimentales son las mismas que en la figura 8. Se muestra un experimento representativo.

Trabajos previos de nuestro laboratorio (Cuevas y cols. 2003), habían demostrado que la administración de antagonistas de CaM, restaura los niveles de p27 hasta niveles similares a los de las células control, e impide el aumento de proliferación, inducido por el suero (Tabla X). La determinación de la vida media de p27 en células de EA, en presencia de CMZ, indica que esta droga actúa enlenteciendo la velocidad de proteólisis de p27 (figura 21). Estos resultados sugieren, además, la importancia de la vía de señalización dependiente de CaM en la mayor respuesta proliferativa de las células de EA.

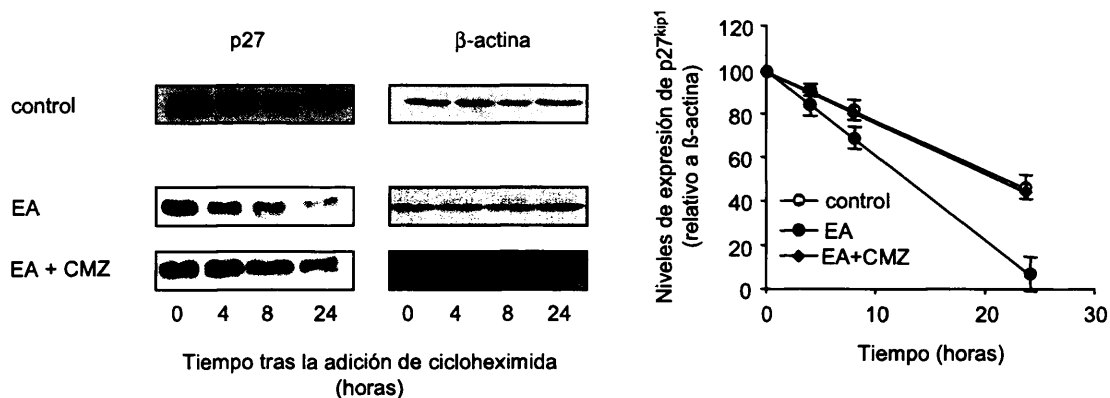


Figura 21.- Vida media de p27 en células de individuos controles y pacientes con EA. Las células se sembraron a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ y se incubaron en RPMI conteniendo 10% de suero, en presencia y en ausencia de $1 \mu\text{M}$ CMZ. A las 24 h de la siembra, se añadieron $10 \mu\text{g/ml}$ de cicloheximida. Tras la adición del inhibidor se recogieron muestras del cultivo a las 4, 8 y 24 h, con las que se determinaron los niveles de p27 mediante western blot, como se representa en el panel A. En el panel B, se representan los resultados del análisis densitométrico de la desaparición de p27 en función del tiempo, en 4 experimentos independientes.

3.2. Papel de la vía ubiquitin-proteasoma en la degradación de p27 en linfocitos inmortalizados

En la mayoría de los tipos celulares, la proteína p27 es degradada por la vía ubiquitin-proteasoma (Pagano y cols., 1995). La proteína p27 es fosforilada en Thr187 fundamentalmente por la acción del complejo ciclina E/CDK2 (Mittnacht, 1998). La fosforilación de este residuo se requiere para la unión de p27 a Skp2, una proteína de la familia F-box, que funciona como el componente receptor del complejo SCF-Ubiquitin ligasa (figura 22). Tras la unión de p27 a Skp2, se produce la ubiquitinización y degradación de la molécula (Dick y cols., 1997), como aparece esquemáticamente representado en la figura 22.

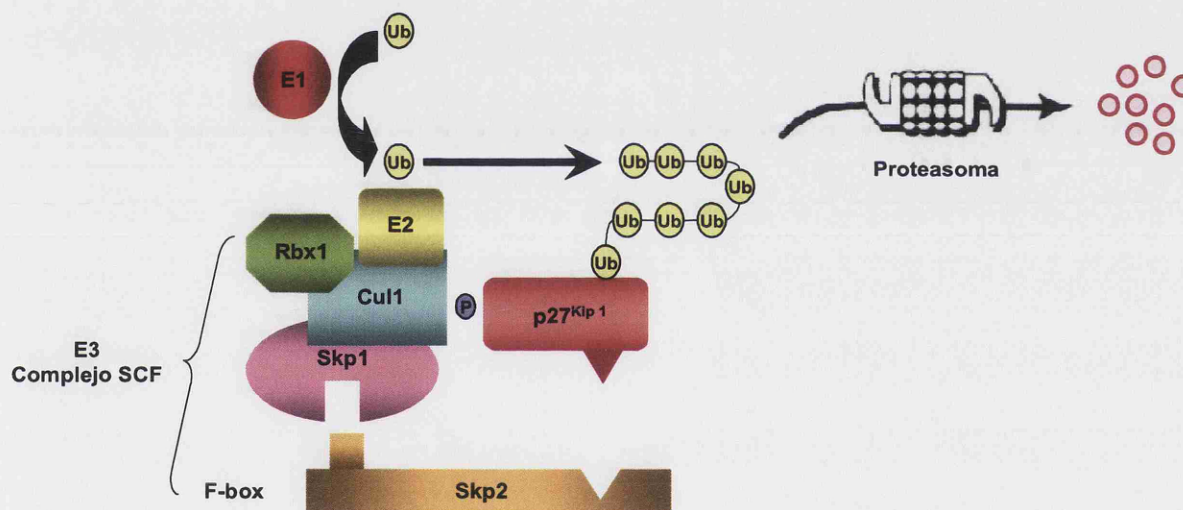


Figura 22.- Vía proteolítica ubiquitin-proteasoma.

Para demostrar la posible participación de este sistema en linfocitos inmortalizados, se determinó, en primer lugar, el efecto de un inhibidor específico de la actividad del proteasoma, el MG132, en los niveles de p27 y en proliferación celular. Como puede observarse en la figura 23, la administración de MG132 produce un aumento del contenido celular de p27 e inhibe proliferación, de forma dosis-dependiente.

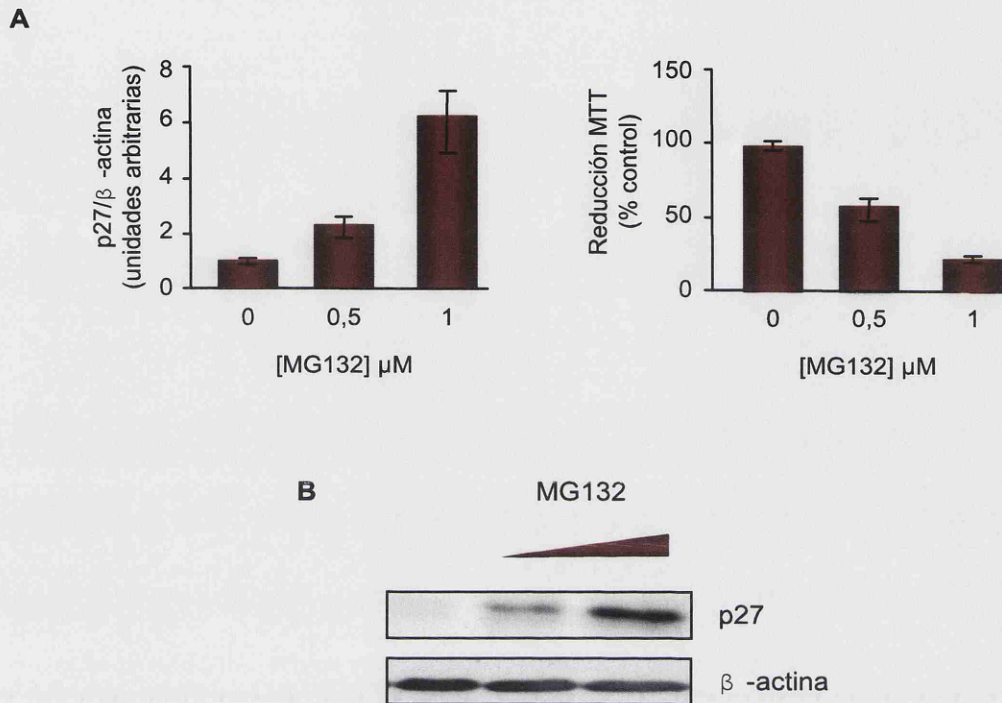


Figura 23.- Efecto del tratamiento con el inhibidor del proteasoma MG132 en los niveles de p27^{kip1} y en la proliferación celular de linfoblastos de EA. Los linfoblastos de individuos con EA se sembraron a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6$ células·ml⁻¹, y se cultivaron durante 24 h en medio RPMI con 10% suero, en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de MG132. Panel A: efecto de las distintas concentraciones de MG132 sobre la proliferación celular y niveles de p27. Panel B: se muestra un experimento representativo de un inmoblottig a las 24h del tratamiento. Los valores muestran la media \pm error estándar de 4 experimentos independientes con líneas celulares procedentes de distintos individuos.

Por otra parte, el análisis comparativo de la degradación de p27, tras el tratamiento con CMZ, en presencia o en ausencia de MG132, también sugiere la participación de esta vía en la degradación de p27. Para los experimentos de la figura 24, se incubaron linfoblastos de pacientes de EA con CMZ, durante 24 h, para incrementar los niveles de p27. Cuatro horas después de la retirada de CMZ, se observa una reducción progresiva de p27 (figura 24), que es impedida casi totalmente, en presencia de MG132.

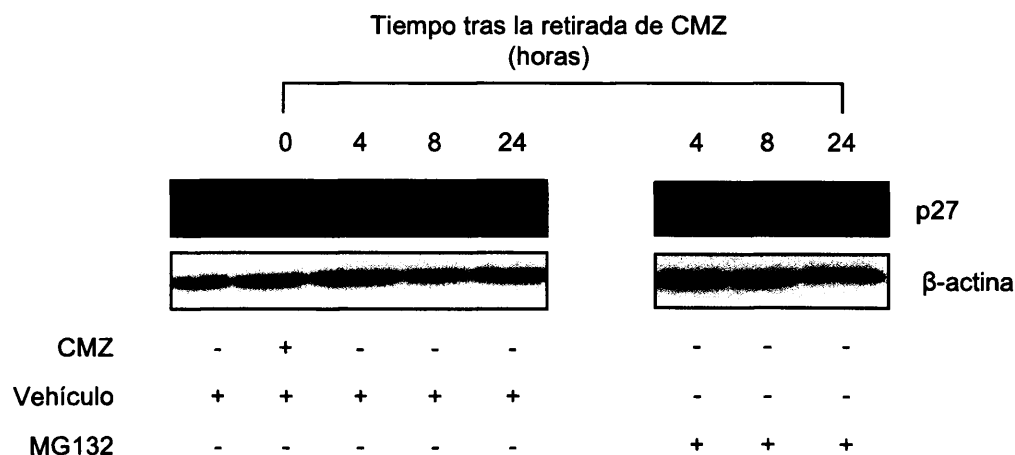


Figura 24.- Análisis comparativo de la degradación de p27, tras el tratamiento con CMZ, en presencia o en ausencia de MG132. Los linfoblastos de individuos con EA se sembraron a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6$ células·ml⁻¹, y se cultivaron durante 24 h en medio RPMI con 10% suero, en presencia o ausencia de 1 μ M CMZ. Posteriormente se retiró el CMZ del medio y las células se incubaron en presencia y ausencia de 10 μ M MG132. A los tiempos indicados en la figura, se tomaron muestras de los cultivos para la detección de p27 por western blot. La figura muestra un experimento representativo.

3.2.1. Actividad del proteasoma en linfoblastos controles y de EA.

El proteasoma 26S es un complejo multiproteico, que se encarga de la degradación temporalmente y de forma ordenada de un número importante de proteínas reguladoras de procesos clave para la homeostasis celular (King y cols., 1996; Naujokat y Hoffman, 2002).

La actividad del proteasoma 26S se puede determinar evaluando la capacidad de los extractos celulares de degradar un compuesto fluorogénico llamado succinil-Leu-Leu-Val-Tyr 7-amino-4-metilcumarina (Dick y cols., 1997). Con este procedimiento, se pudo observar una actividad, ligeramente mayor, en linfoblastos de pacientes con EA como se muestra en la figura 25, (panel A), si bien, la diferencia no fue estadísticamente significativa.

El proceso de degradación de proteínas en el proteasoma comienza con una modificación post-traducciona, que consiste en la ubiquitinización de la molécula, por la unión de ubiquitina a residuos de lisina (Coux y cols., 1996). Este proceso está mediado por las ubiquitin-ligasas E3 (Scheffner y cols., 1995).

Por esta razón, se consideró de interés evaluar si este proceso pudiera estar alterado en las células de pacientes de EA. Para ello, se analizó por ensayos de inmunoblotting, la acumulación de conjugados ubiquitin-proteínas, utilizando anticuerpos anti-ubiquitina. La figura 25, (panel B) muestra un experimento representativo. No se detectaron diferencias significativas en la acumulación de proteínas ubiquitinadas entre los dos tipos celulares, tanto en ausencia como en presencia del inhibidor del proteasoma MG132.

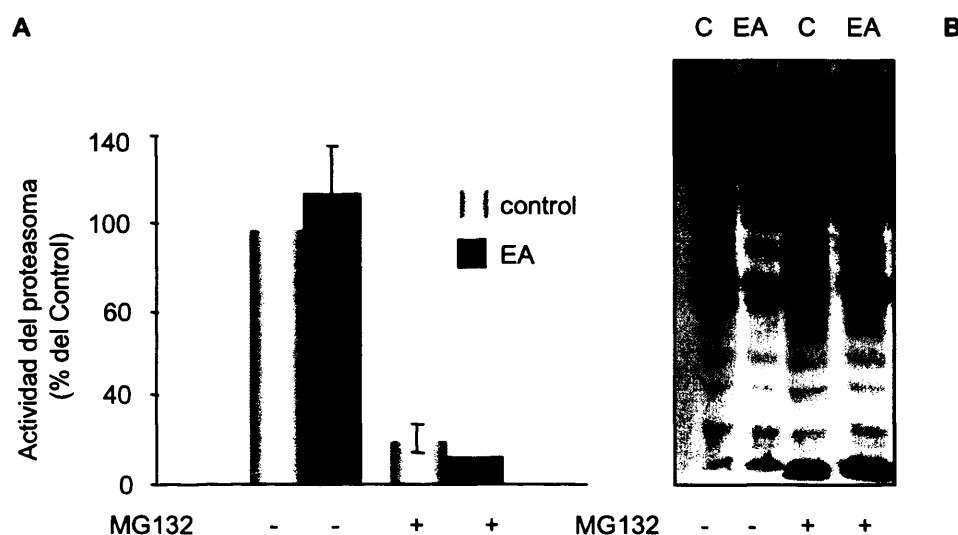


Figura 25.- Actividad del proteasoma en células de individuos controles y pacientes con EA. Los linfoblastos se sembraron a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$, y se cultivaron durante 48h en medio RPMI con 10% suero, en ausencia o presencia de $10 \mu\text{M}$ MG132 como control positivo. A las 48h se tomaron muestras con las que se realizaron extractos para medir la actividad del proteasoma según se describe en Métodos. Panel A: Los resultados son la media \pm error estándar de determinaciones realizadas por triplicado en 6 experimentos diferentes. Panel B: Acumulación de proteínas ubiquitinadas. Las condiciones experimentales son idénticas a las del panel A. Se muestra un inmunoblot representativo revelado con anti-ubiquitina.

3.2.2. Relación entre fosforilación de p27 en Thr187 y niveles de p27 en linfoblastos de donantes controles y de EA.

Dado que la fosforilación de p27 en Thr 187 es un requisito imprescindible para el reconocimiento de la proteína por el complejo SCF del proteasoma, se realizó un estudio comparativo de los niveles de p27 y estado de fosforilación de p27 en

linfoblastos controles y de EA. Puede observarse en la figura 26, la existencia de una relación inversa entre estado de fosforilación y contenido celular de p27. En las células de EA se produce un incremento en los niveles de p27 fosforilada, que se acompaña de un menor contenido de este CDKI respecto al encontrado en las células control.

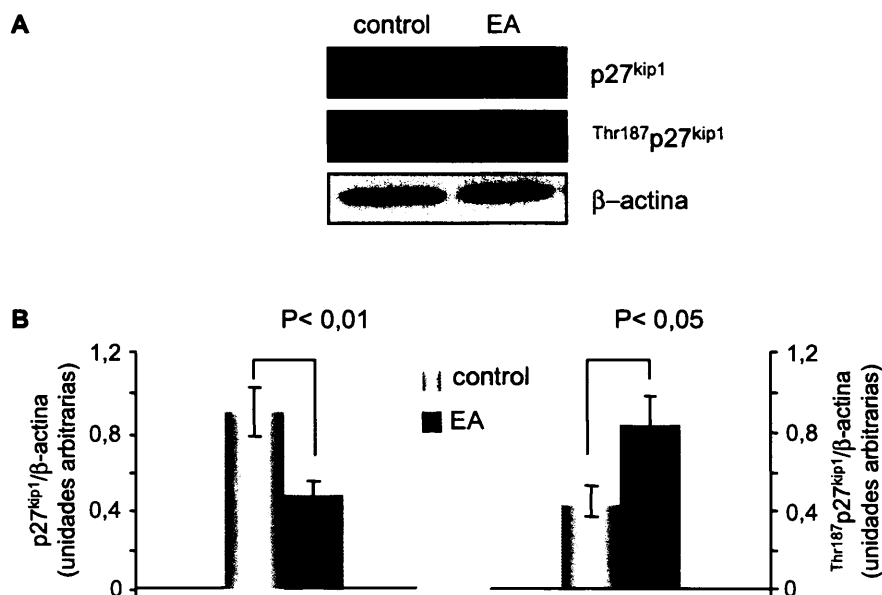


Figura 26.- Relación entre el estado de fosforilación y niveles de expresión de p27^{kip1} en linfoblastos de donantes controles y pacientes con EA. Los linfoblastos se sembraron a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$, y se cultivaron durante 24h en medio RPMI con 10% suero. Se representan western blots de p27^{kip1}, Thr187p27^{kip1} y β-actina (panel A). En el panel B se muestra el análisis densitométrico. Los resultados son la media \pm error estándar de 8 observaciones realizadas con diferentes líneas celulares.

La fosforilación de p27 en Thr187 ocurre, principalmente, mediante la participación del complejo ciclina E/CDK2 (Mittnacht, 1998). La figura 27, muestra un aumento significativo de la actividad del complejo ciclina E/CDK2 en las células de pacientes de EA, en consonancia con la mayor fosforilación de las proteínas de la familia del retinoblastoma en linfoblastos de EA (figura 16). Sin embargo, los niveles de expresión de ciclina E y CDK2 fueron similares tanto en linfoblastos controles como en EA, como se muestra en la figura 28.

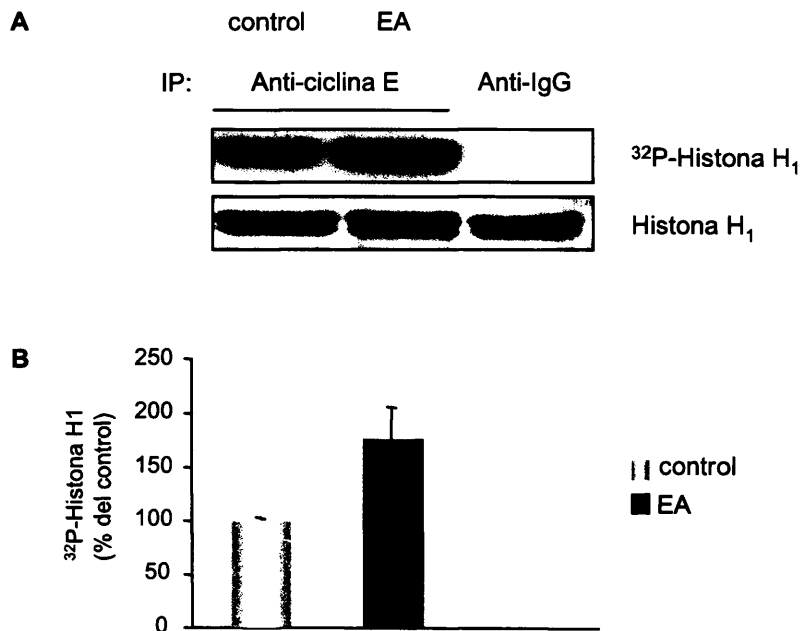


Figura 27.- Actividad quinasa del complejo ciclina E /CDK2 en linfoblastos de donantes controles y pacientes con EA. Los linfoblastos se sembraron a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$, y se cultivaron durante 24h en medio RPMI con 10% suero. Se prepararon extractos para ser inmunoprecipitados usando anti-ciclina E y la actividad quinasa se midió utilizando histona H1 como sustrato. La histona H1 fosforilada se visualizó mediante autoradiografía. Los niveles de histona H1 se determinaron tiñendo el gel con Comassie. Se muestra un experimento representativo, debajo del cuál, esta representado el análisis densitométrico. Los resultados son la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes.

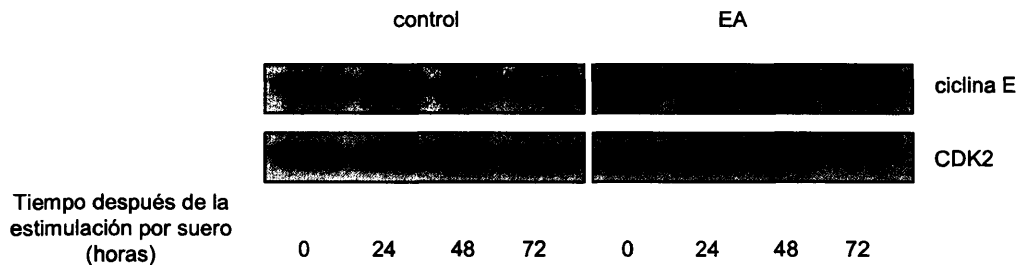


Figura 28.- Expresión de ciclina E y CDK2 en linfoblastos controles y de EA activados por suero. Las células se sembraron a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \text{ células} \cdot \text{ml}^{-1}$ y se privaron de suero durante 24 h. Tras la estimulación con el 10% de suero, cada día, se tomaron muestras del cultivo, se aislaron las proteínas celulares, y se analizaron por western blot.

3.4. Localización celular de p27 en linfoblastos de donantes controles y de EA.

Otro factor que interviene en la regulación de la actividad de p27 es su localización celular. La presencia de p27 en el núcleo, permite que pueda ejercer su función inhibitoria del ciclo celular impidiendo la activación del complejo ciclina E/CDK2. El hecho de que en pacientes con EA se hayan observado alteraciones en el

transporte núcleo citoplasmático de proteínas implicadas en proliferación y supervivencia (Lee y cols., 2006), nos hizo considerar la posibilidad de que hubiera cambios en la distribución subcelular de p27 entre las células controles y de EA que pudieran dar cuenta de las diferencias en la actividad proliferativa. Para estos experimentos, los linfoblastos controles y de EA se inmunotñeron con anticuerpo anti-p27 y se tiñeron los núcleos con DAPI. La figura 29 muestra un experimento representativo en el que se aprecia una mayor presencia de p27 en el núcleo de células controles que en el de células de EA.

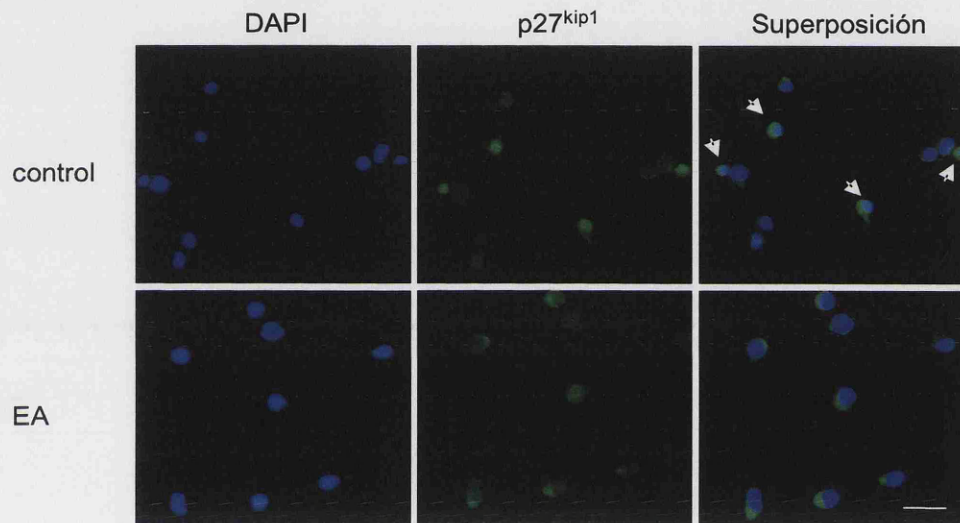


Figura 29.- Localización celular de p27 en linfoblastos de donantes controles y de EA. Los linfoblastos de individuos controles y pacientes con EA se sembraron a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$, y se cultivaron en medio RPMI con 10% suero. A las 24h, se fijaron y se realizó la inmunotinción como se describe en métodos. Las células fueron visualizadas en microscopio de fluorescencia. Se muestra un experimento representativo. Escala: 75 μm

3.4. Estudio de las principales vías implicadas en el control de la fosforilación de p27.

Con objeto de determinar que proteínas quinasas son importantes para la fosforilación/degradación de p27 en linfocitos inmortalizados y cual de ellas podría estar alterada en linfoblastos de pacientes de EA, se utilizó inhibidores selectivos de las principales quinasas involucradas en el control de proliferación/supervivencia celular.

La figura 30 resume los efectos de Ly 294002, inhibidor de PI3-K/Akt y de PD 98059, inhibidor de ERK1/2, sobre proliferación celular y niveles de p27 en linfoblastos de pacientes con EA. La inhibición de PI3-K pero no la de ERK1/2, produjo una

disminución de la proliferación, inducida por el suero, a la vez que se observó un aumento significativo en los niveles de p27. Estos resultados sugieren la participación de la vía de señalización PI3-K/Akt regulando la degradación de p27 y la proliferación celular.

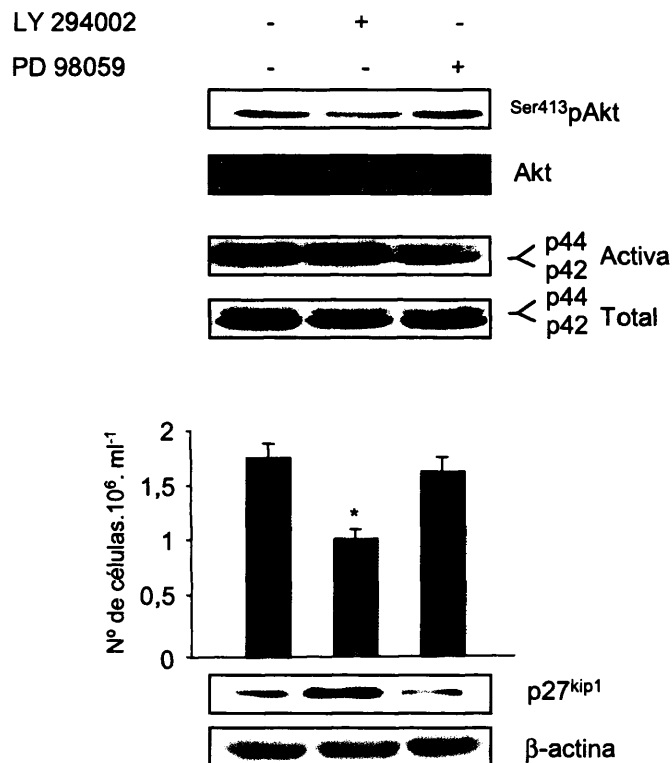


Figura 30.- Efecto de la PI3K/Akt o ERK1/2 sobre el aumento en la proliferación celular en respuesta al suero y sobre el contenido de p27^{kip1} en linfoblastos de pacientes con EA. Las células se sembraron a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6$ células $\cdot \text{ml}^{-1}$, se privaron de suero y se preincubaron durante 30 min, en presencia de 20 μM Ly 294002 o de 20 μM PD 98059. Transcurrido este periodo, se estimularon con 10% suero. Tras 24h de la estimulación con el 10% de suero, se prepararon extractos celulares, las proteínas fueron separadas en geles desnaturalizantes, transferidas a una membrana e incubadas con un anticuerpo primario específico para cada proteína. Se muestran inmunoblots representativos y los resultados de la proliferación que son la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes.

3.4.1. Implicación de PI3-K en el control de la degradación de p27

La posibilidad de que las células de pacientes con EA presenten una actividad mayor de PI3-K se estudió valorando, en primer lugar, la activación de Akt. PI3-K favorece la translocación de Akt a la membrana plasmática donde tiene lugar su activación mediante su fosforilación en los residuos de Ser 473 y Thr 308 (Stokoe y

cols., 1997). La figura 31 muestra un aumento en la fosforilación de Akt en Ser473 tras la estimulación por suero, que persiste durante al menos una hora. En la figura 32 se observó que las células procedentes de pacientes con EA mostraban un aumento de la activación de Akt inducida por el suero respecto a los linfoblastos control.

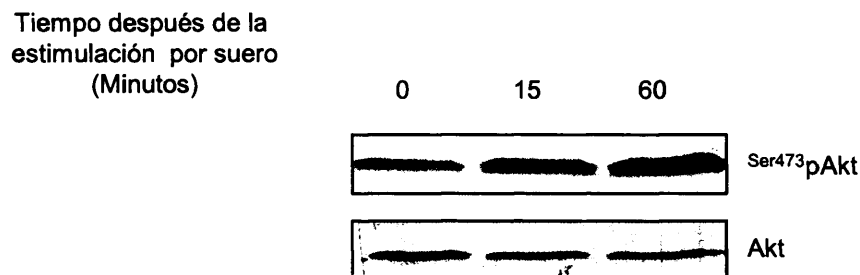


Figura 31.- Activación por suero de la vía PI3K/Akt en linfoblastos. Se sembraron los linfoblastos a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ en RPMI. Tras 24h sin suero, se estimularon con 10% de suero y tomaron alícuotas a los 15 y 60 min. Se representan western blots de fosfo-Akt (serina473) y Akt total.

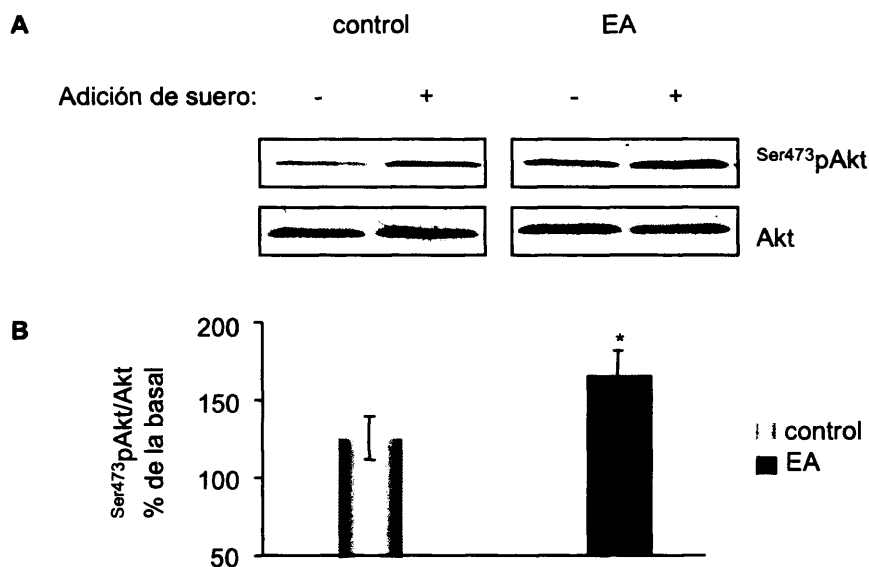


Figura 32.- Activación de la vía PI3K/Akt en linfoblastos de individuos controles y pacientes con EA. Se sembraron los linfoblastos de individuos controles y pacientes con EA a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ en RPMI. Tras 24h sin suero, se estimularon con 10% de suero y tomaron alícuotas a los 15 min. Se representan western blots de fosfo-Akt (serina473) y Akt total tras la estimulación con 10% de suero, durante 15 min, en individuos controles y pacientes con EA (panel A). En el panel B, se muestra el análisis densitométrico. Los resultados son la media \pm error estándar de 8 experimentos independientes *p<0,05.

Por otra parte, se valoró la cinética de los cambios que produce la inhibición de PI3-K/Akt por Ly 294002, en el estado de fosforilación de p27 y en el acúmulo de p27. Los resultados aparecen recogidos en la figura 33.

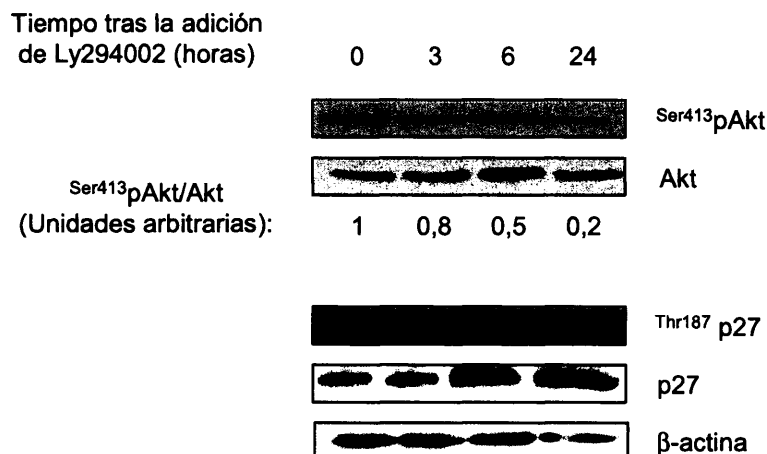


Figura 33.-Cinética de los cambios que produce la inhibición de PI3-K/Akt por Ly 294002, en el estado de fosforilación y acúmulo de p27^{Kip1}. Los linfoblastos de pacientes de EA se sembraron a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ en RPMI con 10% de suero en presencia de 20 μM Ly 294002. A los tiempos indicados en la figura, se tomaron alícuotas de los cultivos para el análisis por western blot. La figura muestra un experimento representativo.

3.5. Papel de Ca^{2+} /CaM en el control de la degradación de p27 mediada por PI3-K/Akt.

Como ya se había mencionado, trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que la mayor respuesta proliferativa de linfoblastos de EA respecto a la de donantes controles depende de Ca^{2+} /CaM (Urcelay y cols., 2001). La adición de antagonistas de CaM inhibe proliferación de linfoblastos de EA, aumentando los niveles celulares de p27 (Cuevas y cols. 2003).

Dado que se ha descrito la activación de PI3-K/Akt por Ca^{2+} /CaM (Pérez-García y cols., 2004; Cheng y cols., 2003), se creyó de interés estudiar el papel de Ca^{2+} /CaM en la regulación de p27 inducida por PI3-K/Akt. Con este fin, se determinó la actividad de PI3-K/Akt, estado de fosforilación de p27 en Thr 187 y contenido celular de p27 en presencia del antagonista de CaM, calmidazolium (CMZ). La figura 34 muestra que la administración de CMZ produce una inhibición de la fosforilación de Akt, que se acompaña de una menor fosforilación de p27 y de un aumento de los niveles de p27.

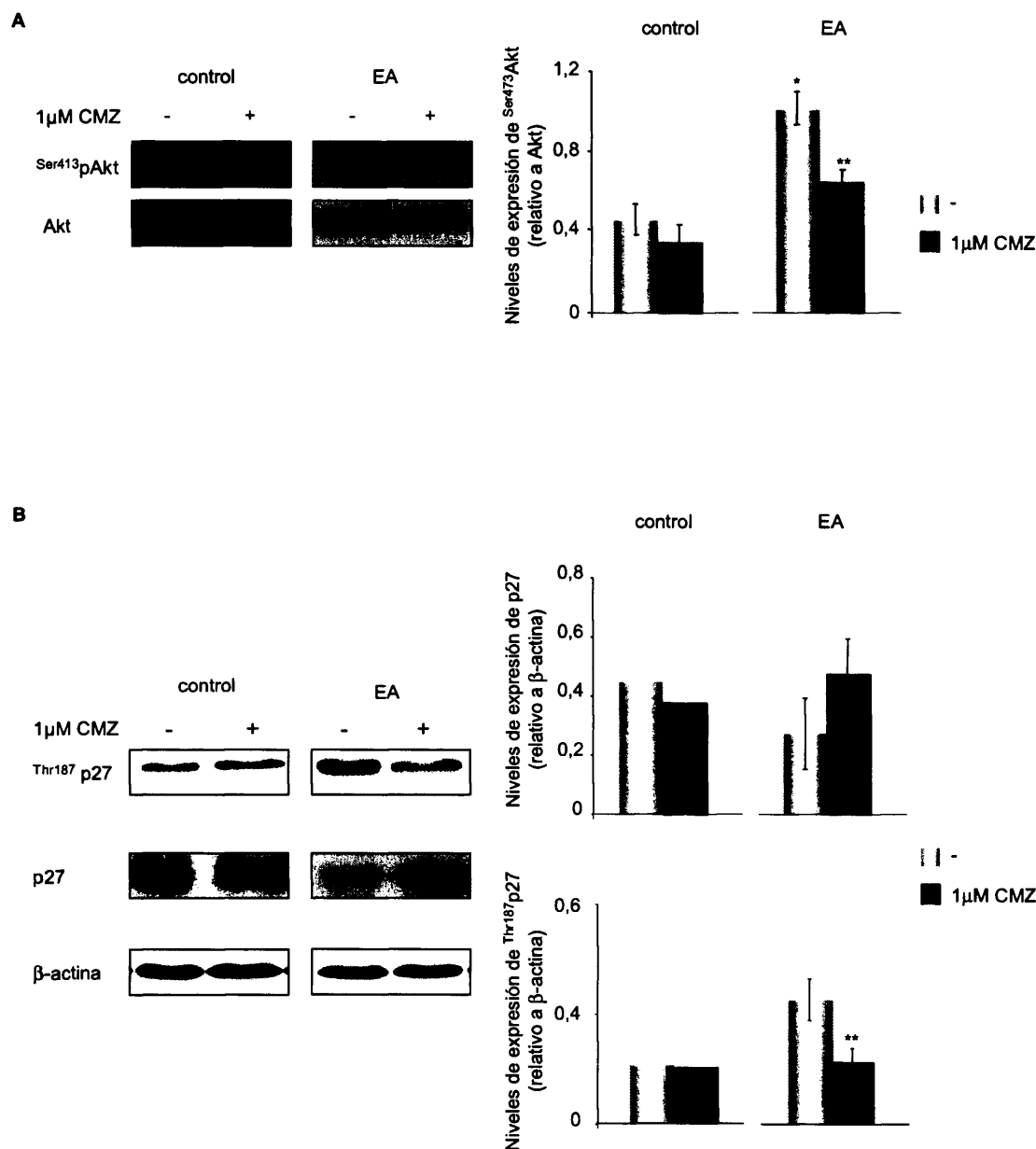


Figura 34.- Efecto del tratamiento con CMZ sobre la activación de Akt y la expresión y fosforilación de p27 en linfoblastos de individuos controles y enfermos de EA. Panel A: Los linfoblastos de individuos controles y pacientes de EA se sembraron a una densidad inicial $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ en RPMI sin suero durante 24 h. Tras 30 min de incubación, en presencia o ausencia de 1 μ M de CMZ, las células fueron estimuladas con 10% FBS durante 30 min. Los niveles de fosfo Akt (Ser473) y Akt total se determinaron por western blot. A la derecha, se muestra el análisis densitométrico. Los resultados son la media \pm error estándar de 6 experimentos independientes. Panel B: Los linfoblastos de individuos controles y de pacientes de EA se incubaron durante 24 h en medio RPMI conteniendo 10% de FBS en ausencia o en presencia de 1 μ M de CMZ. Se muestran western blots representativos de 5 experimentos y, a la derecha el análisis densitométrico de los resultados. * $p < 0,05$ respecto al control, ** $p < 0,05$ respecto a las células de EA incubadas en ausencia de CMZ.

Con objeto de comprobar la especificidad de la inhibición de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ por el CMZ, se analizó el efecto de otro antagonista de CaM, no relacionado estructuralmente con el CMZ, como es el W13, sobre la fosforilación de Akt. Estos resultados se recogen en la figura 35.

La adición de los distintos antagonistas de CaM a las células control no produjo ningún efecto en los niveles de fosforilación de Akt. Por el contrario, la mayor activación de Akt, característica de células de pacientes con EA, disminuye en presencia de W13, pero no en presencia de W12, un análogo no activo (figura 35).

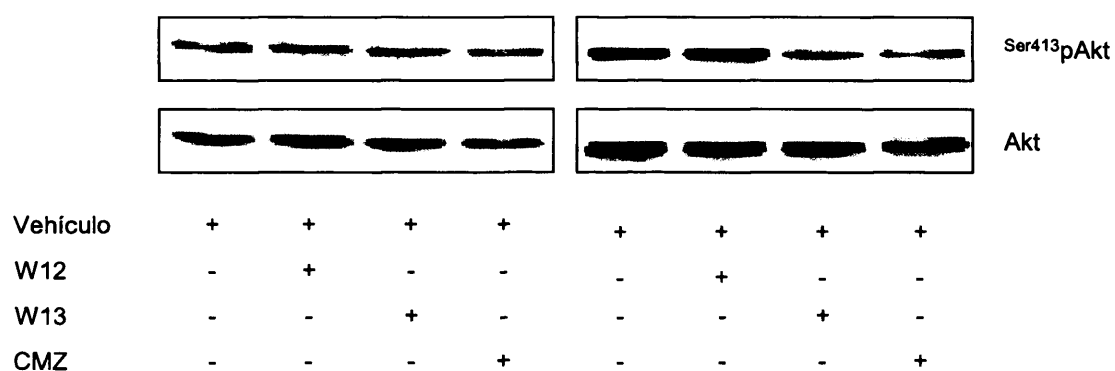


Figura 35.- Efecto del tratamiento con compuestos anti CaM sobre la activación de Akt en linfoblastos de individuos controles y enfermos. Los linfoblastos se sembraron a una concentración de $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$, en medio RPMI sin suero, durante 24 h. Media hora antes de la adición de 10% suero fueron preincubados en ausencia o presencia de 10 μM W12, 10 μM W13 o 1 μM CMZ. A las 24 h de la estimulación, se tomaron alícuotas para la determinación por western blot de fosfo Akt (Ser473) y Akt total. La figura muestra un experimento representativo.

Estos resultados sugieren la participación de la ruta $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, modulando los efectos de la activación de PI3-K/Akt en el control de la fosforilación y degradación de p27. Esta idea se apoya, también, en el hecho de que los antagonistas de CaM no afectaron a la actividad global del proteasoma de células de EA y a la acumulación de proteínas ubiquitinizadas, como se muestra en la figura 36.

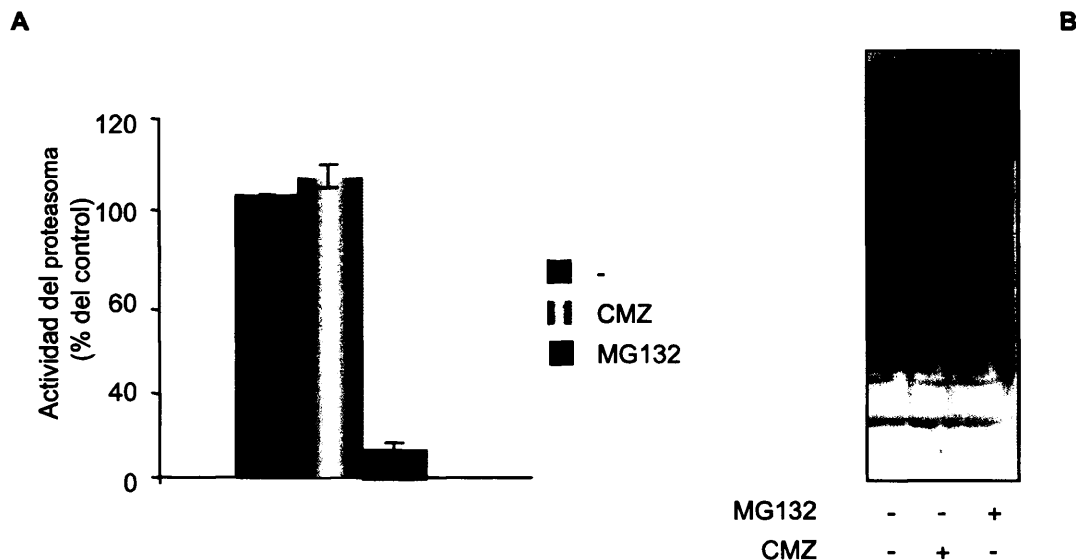


Figura 36.- Efecto de antagonistas de CaM en la actividad global del proteasoma de células de EA. Los linfoblastos se sembraron a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$, y se cultivaron durante 48h en medio RPMI con 10% suero, en ausencia o presencia de $1 \mu\text{M}$ CMZ y $1 \mu\text{M}$ MG132 como control positivo. A las 48h, se tomaron muestras con las que se realizaron extractos para medir la actividad del proteasoma según se describe en Métodos. Panel A: los resultados representan la media \pm error estándar de 6 experimentos distintos. Panel B: se muestra un inmunoblot representativo, revelado con un anticuerpo anti-ubiquitina.

3.6. Efecto de la inhibición de CaM quinasa II y calcineurina en la fosforilación de Akt y contenido celular de p27.

La figura 37 muestra que la inhibición de calcineurina por ciclosporina (Liu y cols., 1991) o la inhibición de CaM quinasa II por KN62 (Tokumitsu y cols., 1990), no tuvo ningún efecto sobre la fosforilación de Akt, ni afectó a los niveles celulares de p27, lo que descarta que los efectos de CaM sean mediados por estas proteínas.

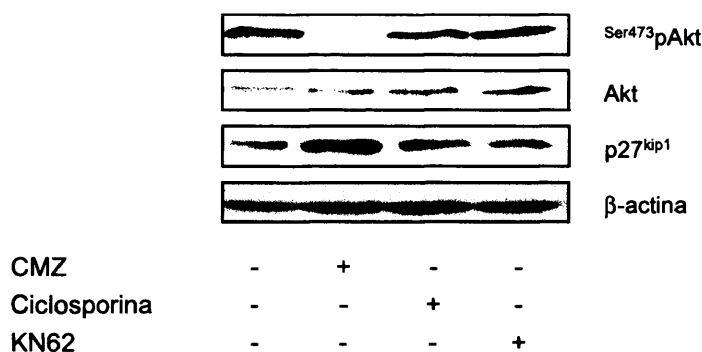


Figura 37.- Efecto de la inhibición de CaMKII o calcineurina en la activación de Akt y contenido celular de p27. Los linfoblastos de pacientes con EA fueron preincubados durante 30 min en presencia de $1 \mu\text{M}$ CMZ, $1 \mu\text{M}$ KN62 o $2 \mu\text{g/ml}$ de ciclosporina A, luego fueron estimulados con 10% suero. A las 24 h, se recogieron los extractos para la determinación de los niveles de fosfo-Akt (Ser473), Akt total y p27^{kip1} por western blot. La figura muestra un experimento representativo.

4. Papel de la activación de PPAR γ en la respuesta proliferativa de linfoblastos controles y de EA.

Este apartado describe una serie de experimentos encaminados a elucidar la influencia de la activación de PPAR γ en la estimulación de la respuesta proliferativa de linfoblastos de pacientes de EA. PPAR γ pertenece a la superfamilia de receptores nucleares, puede formar heterodímeros con el receptor de retinoide y regular la transcripción de genes pro-inflamatorios y otros relevantes para el control de la supervivencia celular. El objetivo de estos experimentos viene justificado por las observaciones que indican un aumento de expresión de PPAR γ en cerebros de pacientes de EA, lo que sugiere que puede jugar un papel relevante en la respuesta neuroinflamatoria (Kitamura y cols., 1999). Por otra parte, algunos estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que el tratamiento prolongado con antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) puede prevenir o retrasar el desarrollo de la EA (Breitner, 1996; in't Veld y cols., 2001; Stewart y cols., 1997). Los AINEs y las prostaglandinas de la serie J₂ son ligandos del PPAR γ (Jiang y cols., 1998; Ricote y cols., 1998). En base a los efectos antiproliferativos y proapoptóticos de la activación de PPAR γ observados en algunos tipos celulares, se consideró la posibilidad de que la acción aparentemente neuroprotectora de los ligandos de PPAR γ estuviese mediada por la inhibición del ciclo celular.

4.1. Expresión y activación de PPAR γ

La figura 38 muestra que los linfoblastos de individuos controles y de EA expresan niveles similares de PPAR γ en presencia o en ausencia del ligando natural 15d-PGJ₂.

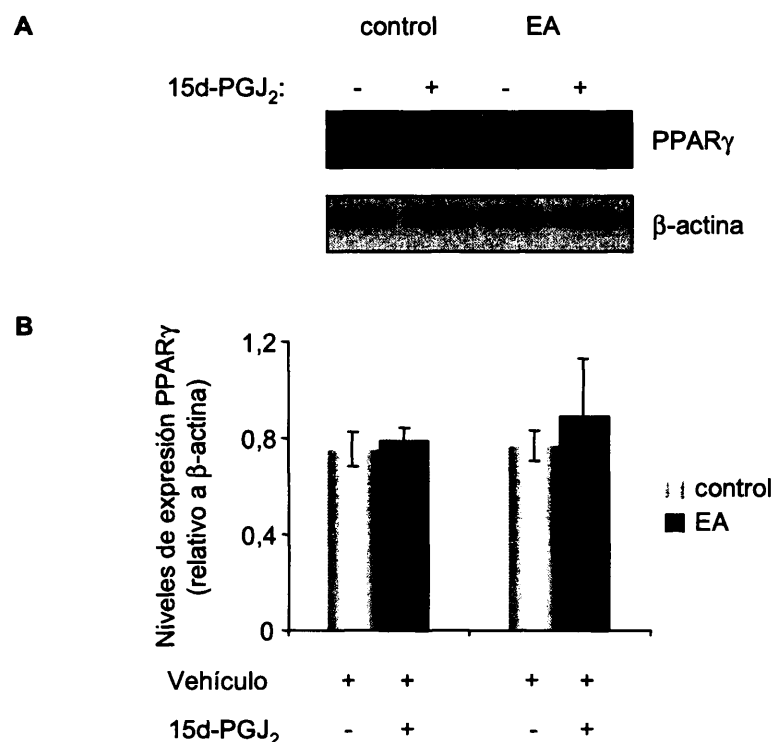


Figura 38.- Niveles de expresión de PPAR γ en linfoblastos de individuos controles y pacientes de Alzheimer.

Los linfoblastos procedentes de individuos controles y EA se sembraron a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6$ células ml^{-1} en medio RPMI con 10% de suero, en presencia y ausencia 2,5 μM de 15d-PGJ₂. A las 48 h se prepararon los extractos celulares y se analizaron por Western Blot. Los valores de la expresión de PPAR γ representados son la media \pm error estándar de cuatro experimentos distintos, realizados con individuos diferentes.

Para determinar si la adicción de 15d-PGJ₂ era capaz de activar a PPAR γ , se analizó por ensayos de retardo en gel (EMSA) la capacidad de PPAR γ de unirse a oligonucleótidos que contienen secuencias específicas, tal y como se describe en Métodos. La figura 39 muestra que aumenta la capacidad de PPAR γ de unirse al ADN en presencia del ligando 15d-PGJ₂, tanto en células controles como en linfoblastos de EA. La especificidad de unión al ADN fue confirmada por ensayos de competición en los cuales se añadió un exceso de 100 veces de sonda sin marcar.

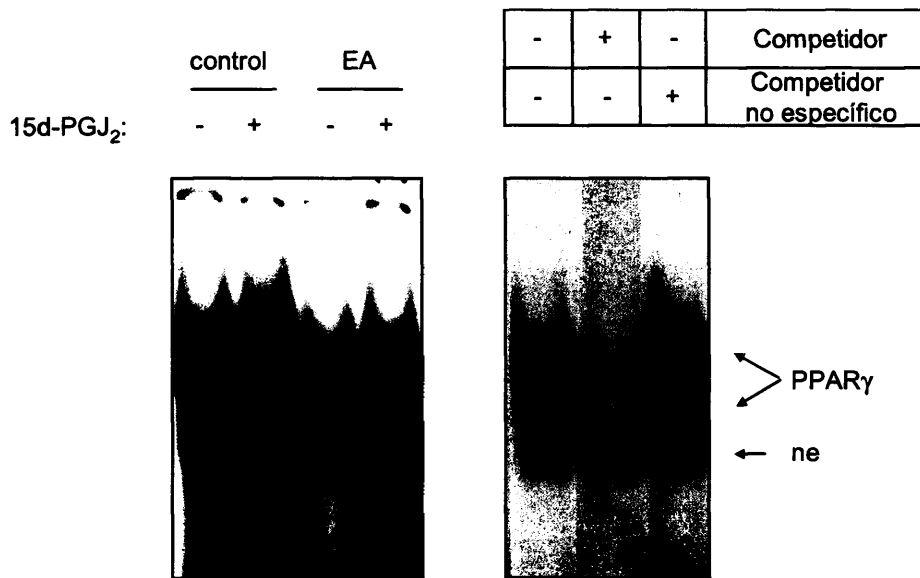


Figura 39.- PPAR γ es activado tras el tratamiento con 15d-PGJ₂ en los linfoblastos tanto de individuos controles como en los de EA. Los linfoblastos procedentes de individuos controles y EA se sembraron a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6$ células ml^{-1} en medio RPMI con 10% de suero, en presencia y ausencia 2,5 μM de 15d-PGJ₂. A las 24 h, se prepararon los extractos celulares, y se analizaron por EMSA. La especificidad de la unión PPAR γ -ADN se determinó con un exceso de sonda sin marcar y con un oligonucleótido de secuencia inespecífica, ne.

4.2. Efecto de 15d-PGJ₂ sobre la proliferación celular. Dosis respuesta.

Para analizar los efectos de la 15d-PGJ₂ sobre la actividad proliferativa en respuesta al suero de linfoblastos controles y de pacientes con EA, se realizaron experimentos de dosis respuesta, a lo largo del tiempo, en estas células. En la figura 40, se muestra que la tasa proliferativa de linfoblastos de EA fue significativamente mayor que la de células controles, de acuerdo con trabajos previos de nuestro laboratorio (Cuevas y cols., 2003; Urcelay y cols., 2001). También, se vió que las células tratadas con 15d-PGJ₂, mostraban una inhibición significativa del crecimiento celular, tanto en linfoblastos de controles como de EA, de una manera dependiente de la dosis. Curiosamente, la susceptibilidad de las células a la acción inhibitoria de la droga fue diferente en pacientes con EA respecto a los controles, ya que, mientras que el crecimiento celular en células de pacientes con EA disminuye a concentraciones de $1\mu\text{M}$, fue preciso aumentar la dosis de la droga cinco veces para observar inhibición en

células controles. A dosis de 5 o de 10 μM de la 15d-PGJ₂ no hay crecimiento celular y se observa una disminución del número inicial de células en los cultivos tanto de controles como de pacientes con EA.

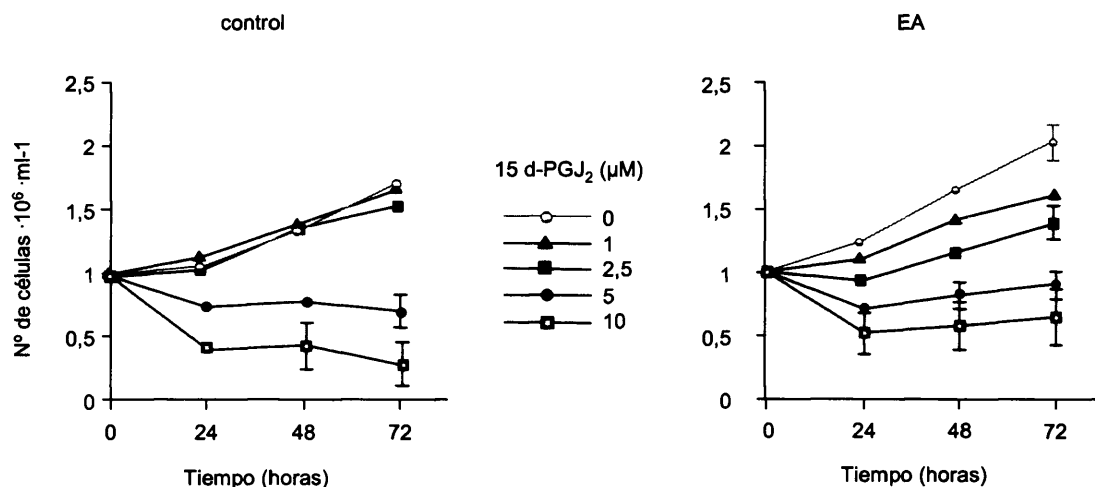


Figura 40.- Efectos de concentraciones crecientes de 15d-PGJ₂ sobre la proliferación en linfoblastos de individuos controles y con EA. Los linfoblastos procedentes de individuos controles y EA se sembraron a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \text{ células} \cdot \text{ml}^{-1}$ en medio RPMI con 10% de suero, en presencia de concentraciones crecientes de 15d-PGJ₂, durante tres días. Cada día del experimento se tomaron muestras para el ensayo de proliferación. Los valores muestran la media \pm el error estándar de cuatro experimentos independientes tomados de líneas celulares de distintos individuos. Cuando las barras de error no se muestran, el error es menor que el tamaño del símbolo correspondiente

El análisis del estado ciclo celular, por citometría de flujo, reveló que la aparición de células hipodiploides, en la fase sub G₀/G₁, característica de apoptosis/necrosis, ocurría sólo a altas concentraciones de 15d-PGJ₂, tanto en células controles como en linfoblastos de pacientes con EA. Sin embargo, a dosis bajas de 15d-PGJ₂ (1 o 2,5 μM), no se observaron evidencias de apoptosis ni de citotoxicidad como se puede observar en la figura 41.

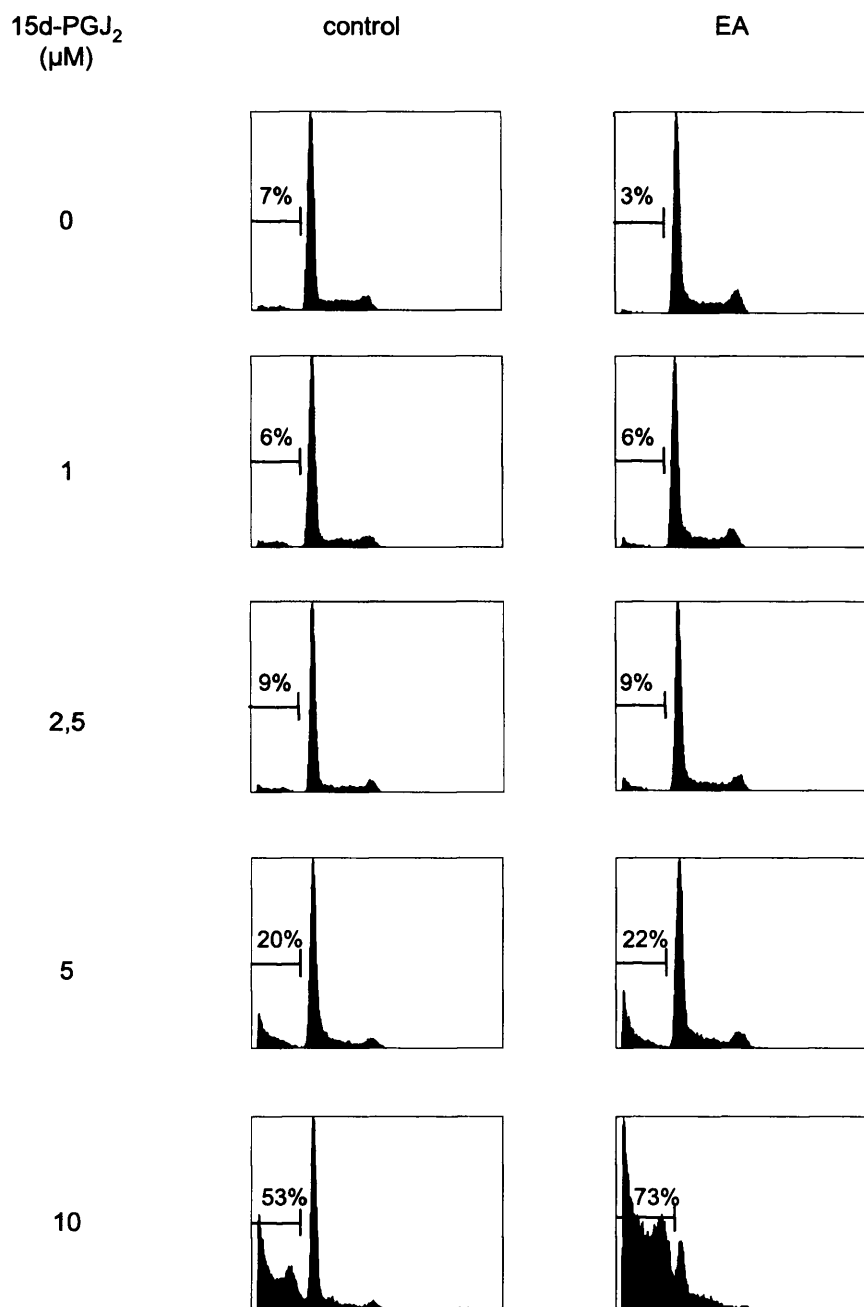


Figura 41- Efectos de concentraciones crecientes de 15d-PGJ₂ en la distribución del ciclo celular de linfoblastos de controles y de EA. Las condiciones experimentales son idénticas a las descritas en la leyenda de la figura 28. Después de las 48 h de la estimulación con suero, las células fueron lavadas, fijadas y analizadas por citometría de flujo como se describe en Métodos. Se muestra el porcentaje de células hipodiploides en fase sub G₀/G₁.

Estos resultados sugirieron que la inhibición mediada por dosis bajas 15d-PGJ₂, del incremento del número de células de EA en respuesta al suero, se debía a la inhibición de la proliferación celular, más que a un efecto apoptótico o citotóxico.

Estas observaciones están apoyadas también por experimentos en los que se utilizaron como marcadores de apoptosis y necrosis, Anexina V acoplada a fluoresceína (FICT) y el IP, respectivamente. La figura 42 muestra un experimento representativo donde el tratamiento de linfoblastos de pacientes de EA con 2,5 μM de 15d-PGJ₂ durante 48 horas no produjo cambios significativos en la fracción de células apoptóticas o necróticas, manteniendo, además un 80% de células viables. Como control positivo de apoptosis y de necrosis celular, se incubaron los linfoblastos con 1 μM estaurosporina durante tres horas.

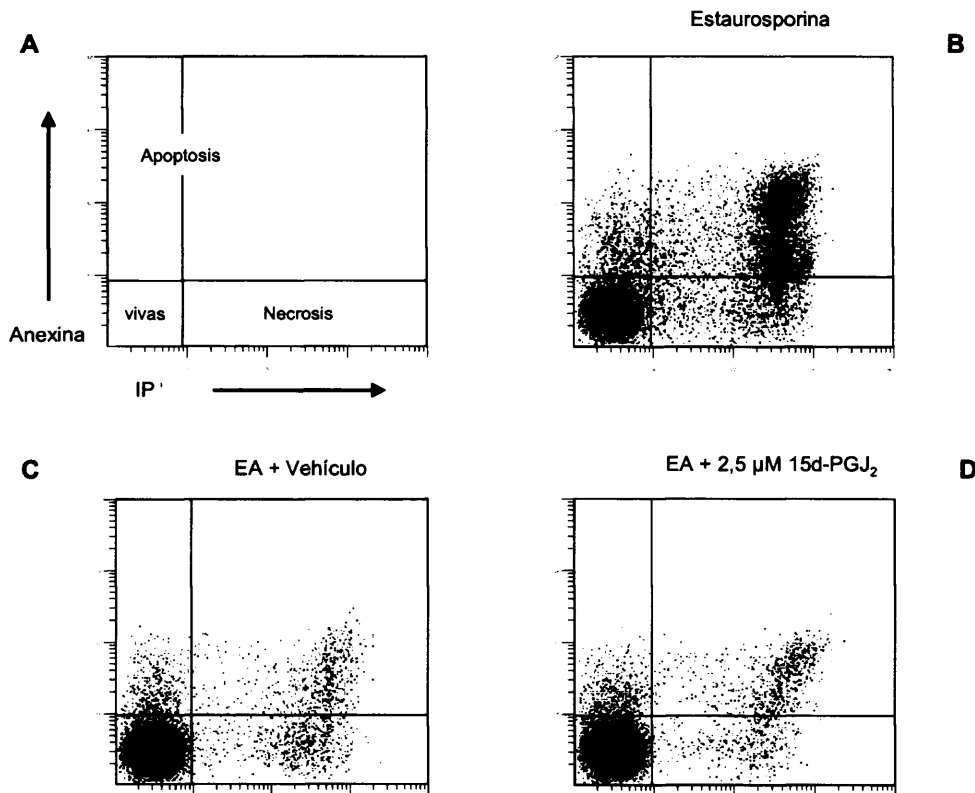


Figura 42- El tratamiento de linfoblastos de pacientes de EA con dosis bajas de 15d-PGJ₂ no induce ni apoptosis ni necrosis. Se analizó la exposición de fosfatidilserina al medio extracelular y la exclusión de IP tras el tratamiento con Anexina V- fluoresceína e IP. En la parte positiva para el IP (eje x) las células necróticas. Las células viables aparecen negativas para ambas fluorescencias (panel A). El control positivo de apoptosis y necrosis se realizó incubando los linfoblastos en presencia de estaurosporina 1 μM (panel B). En los paneles C y D se muestra un experimento representativo del análisis de linfoblastos de pacientes con EA incubados en ausencia o presencia de 2,5 μM de 15d-PGJ₂ durante 48 horas.

En los siguientes experimentos se eligió la concentración de $2,5 \mu\text{M}$ de 15d-PGJ_2 ya que, fue la concentración en la que observamos máximas diferencias en las células de EA, sin afectar a la proliferación de células controles, como se muestra en la figura 41. El efecto inhibitorio de 15d-PGJ_2 vimos que era dependiente del tiempo produciendo un decremento del 30-40% en el total del número de células en cultivos de EA después de tres días de tratamiento (figura 43).

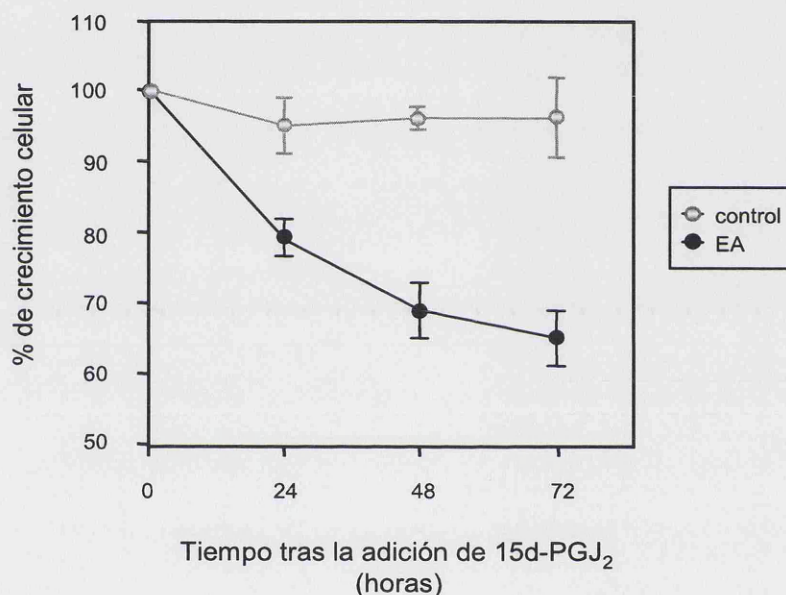


Figura 43.- Efectos de 15d-PGJ_2 en la actividad proliferativa mediada por el suero de linfoblastos controles y de EA. Los linfoblastos procedentes de individuos controles y EA se sembraron a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \text{ células} \cdot \text{ml}^{-1}$ en medio RPMI con 10% de suero en ausencia o presencia de $2,5 \mu\text{M}$ de 15d-PGJ_2 . Cada día del experimento se tomaron muestras para el recuento del número de células. El porcentaje de crecimiento celular esta referido en tanto por ciento de células no tratadas, considerado este último como el 100%. Los valores muestran la media \pm el error estándar de seis a ocho experimentos independientes tomados de líneas celulares de distintos individuos.

La figura 44 muestra que el efecto antiproliferativo de 15d-PGJ_2 es reversible. Para estos experimentos, se incubaron linfoblastos de pacientes de EA durante 24 horas en ausencia o en presencia de 15d-PGJ_2 . Pasado este tiempo, se retiró la droga y se mantuvieron los cultivos celulares durante 72 horas. Como control positivo, se incubaron linfoblastos de EA en presencia de 15d-PGJ_2 desde el momento de la

siembra. Puede observarse en la figura 44 que tras la retirada de la 15d-PGJ₂ se restaura la tasa de proliferación celular.

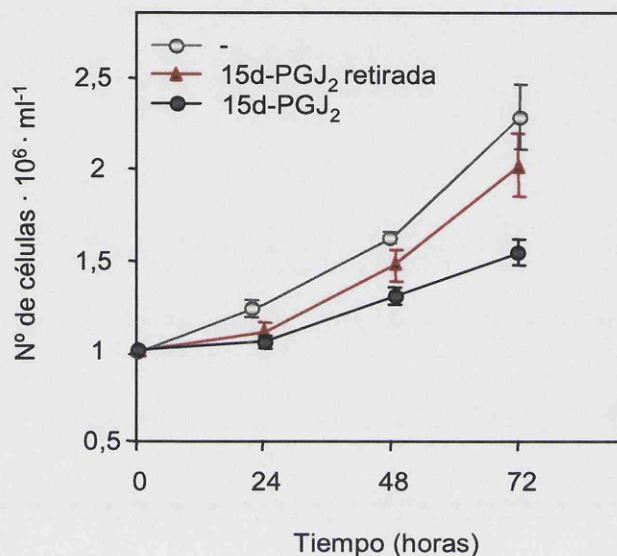


Figura 44.- El efecto de la 15d-PGJ₂, inhibiendo la respuesta proliferativa al suero de linfoblastos de EA es reversible. Los linfoblastos procedentes de individuos con EA se sembraron a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6$ células·ml⁻¹ en medio RPMI con 10% de suero en ausencia o presencia de 2,5 μ M de 15d-PGJ₂ durante 72 h. A las 24 h se cambió el medio para retirar la droga y se hizo un recuento del número de células cada día. Los valores muestran la media \pm el error estándar de seis experimentos independientes tomados de líneas celulares de distintos individuos.

La acción antiproliferativa de 15d-PGJ₂ no parece estar mediada por PPAR γ . Para investigar el posible papel de PPAR γ en la acción antiproliferativa de 15d-PGJ₂ se estudió, en primer lugar, el efecto 15d-PGJ₂ en el crecimiento de linfoblastos de EA tras la estimulación con suero en presencia y en ausencia de dos antagonistas específicos de PPAR γ como son el GW9662 y T0070907 (Leesnitzer y cols., 2002; Lee y cols., 2002). Como se puede observar en la figura 45, estos antagonistas no son capaces de prevenir el efecto de la 15d-PGJ₂ en la proliferación. Por otra parte, se analizó la influencia de otros ligandos del PPAR γ , como las tiazolidinedionas (rosiglitazona) (Willson y Wahli, 1997) o los AINES (Indometacina) (Lehmann y cols., 1997) y ninguno de estos compuestos mimetizó el efecto inhibitorio en la proliferación de la 15d-PGJ₂ en los linfoblastos de EA (figura 45). Se sabe que los ligandos del PPAR γ y del receptor del ácido 9-cis-retinoico (RXR α) actúan sinérgicamente en la activación de la transcripción

(Kliwer y cols., 1992). Sin embargo, el cotratamiento de las células con 15d-PGJ₂ y ácido 9-cis-retinoico no cambió, la inhibición producida por la 15d-PGJ₂ en la proliferación de linfoblastos de EA, como se muestra en la figura 45. Todos estos resultados indican que la inhibición del crecimiento celular por 15d-PGJ₂ no es consecuencia de procesos de señalización mediados por el PPAR γ .

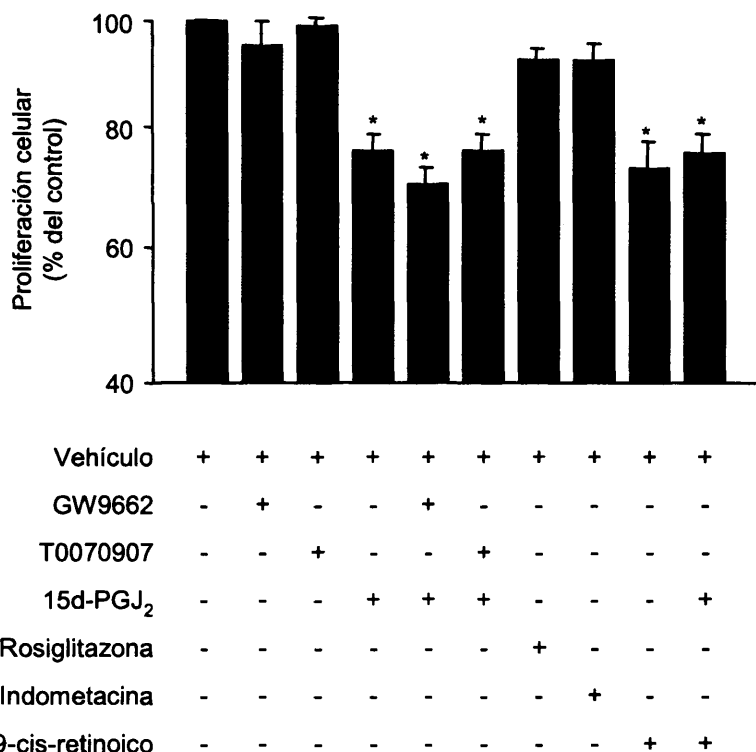


Figura 45- Efectos de diferentes ligandos del PPAR γ y del ácido 9-cis-retinoico en la proliferación de linfoblastos de EA. Los linfoblastos de pacientes controles y de enfermos se incubaron en placas de 96 pocillos a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6$ células·ml⁻¹ por triplicado, con 10 μ M de GW9662, 10 μ M de T0070907 o 2 μ M de ácido 9-cis-retinoico en presencia o en ausencia de 2,5 μ M de 15d-PGJ₂, 10 μ M de rosiglitazona y 10 μ M de indometacina, durante 24 h. El estudio de proliferación celular se llevó a cabo mediante Cyquant. Los valores muestran la media \pm el error estándar de cuatro experimentos independientes, realizados con líneas celulares de distintos individuos. *p<0.01, con respecto a la actividad basal.

4.2.1. Efecto de la 15d-PGJ₂ sobre el ciclo celular.

En trabajos previos de nuestro laboratorio, el análisis del ciclo celular de linfoblastos de individuos controles y de pacientes con EA (Cuevas y cols., 2003) sugirió la posible perturbación del tránsito de la fase G₁ a S del ciclo celular en las

células de pacientes con EA. Por esta razón, se trató de averiguar si la 15d-PGJ₂ actúa en este punto.

El análisis de la distribución de células en las distintas fases del ciclo celular, por citometría de flujo, mostró que la adición de 15d-PGJ₂ no afectaba al perfil del ciclo celular en los linfoblastos de individuos controles. Sin embargo, aumentó el porcentaje de células en la fase G₀/G₁ y disminuyó el de células en fase S/G₂M en linfoblastos de pacientes con EA, como se muestra en la figura 46.

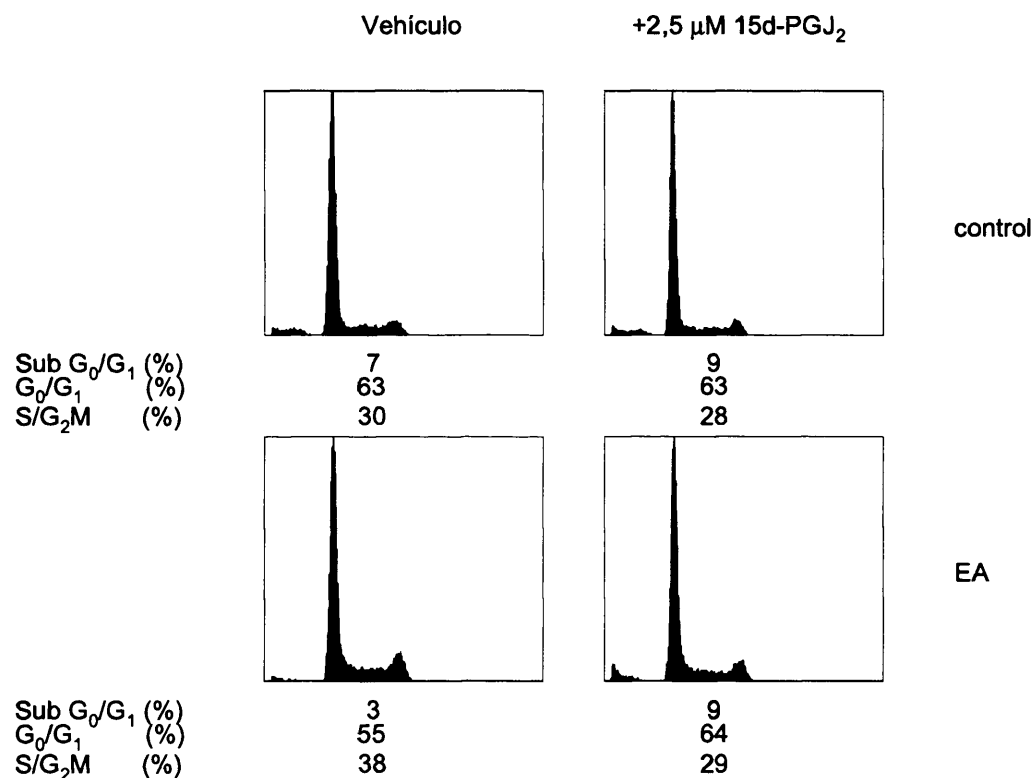


Figura 46.- Efecto de la 15d-PGJ₂ en la distribución del ciclo celular en linfoblastos de controles y EA. Se sembraron las células a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ en medio RPMI sin suero. 48 h después de la activación con 10% suero, las células se recogieron y fueron lavadas, fijadas y analizadas por citometría de flujo como se describe en los Métodos. Se muestra el porcentaje de células hipodiploides en fase sub G₀/G₁, como también el de células en fase G₀/G₁ y S/G₂M.

A continuación, se midieron los efectos de la 15d-PGJ₂ a diferentes tiempos, tras la estimulación con suero de los linfoblastos de EA, mostrando que esta droga no fué

efectiva si se añadía doce horas después de la activación por el suero. Este periodo de tiempo está dentro del estimado para la fase G₁ en linfoblastos de EA (Cuevas y cols., 2003), sugiriendo que la actuación 15d-PGJ₂ ocurre durante la fase G₁ del ciclo celular.

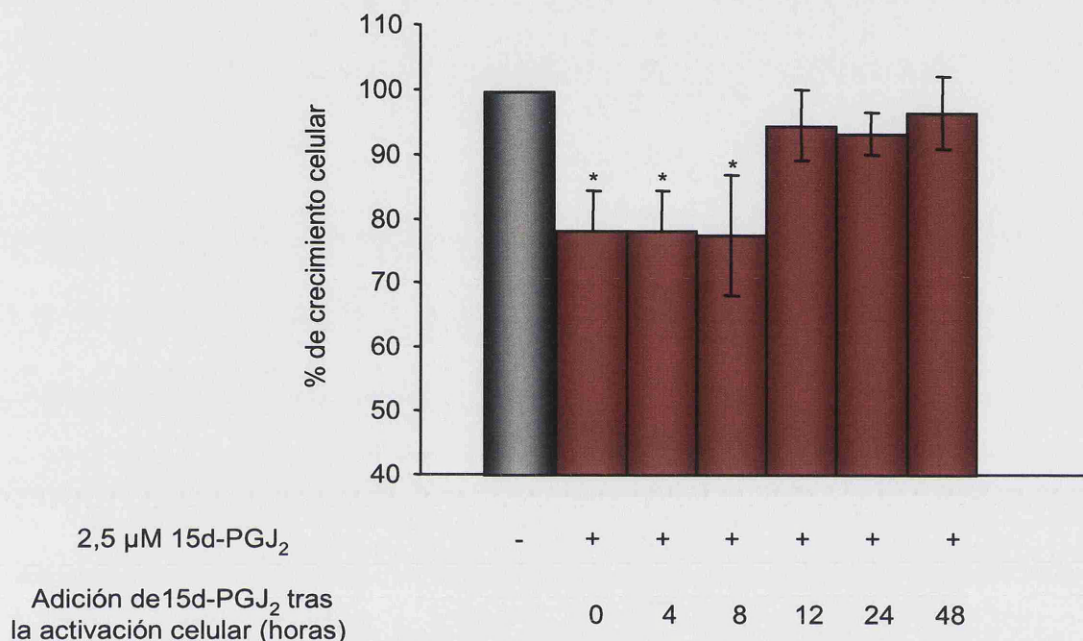


Figura 47.- Efecto de la adición de 15d-PGJ₂ a distintos tiempos en el aumento de proliferación de linfoblastos de EA. Los linfoblastos de pacientes con EA fueron privados de suero durante 24 h, sembrados a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6$ células·ml⁻¹ y activados añadiendo un 10% de suero. La 15d-PGJ₂ se añadió a los tiempos indicados en la figura, tras la activación celular. A las 72 h, se recogieron las células y se realizó el recuento de las células viables en cámara Neubauer por exclusión de azul de tripan. Los valores representados son la media \pm el error estándar de seis experimentos independientes.*p<0.05.

4.2.2. Efectos de la 15d-PGJ₂ en la expresión y el estado de fosforilación de proteínas reguladoras del ciclo celular.

La figura 48 muestra el efecto de la 15d-PGJ₂ sobre los niveles de expresión y fosforilación de pRb, así como los niveles de p27 a lo largo del tiempo. Puede observarse que, de acuerdo con observaciones previas (Cuevas y cols., 2003), tanto en linfoblastos controles como en pacientes con EA, hubo un aumento transitorio de pRb, que alcanzó niveles máximos a las 24 h. La comparación entre estos dos grupos reveló una mayor respuesta al suero en los linfoblastos de EA, en el contenido celular y fosforilación de pRb, de acuerdo con los trabajos previos de nuestro laboratorio (Cuevas y cols., 2003). Asimismo, se observó que el contenido en p27 de las células de

pacientes con EA era menor que en las controles. El tratamiento con 15d-PGJ₂ no tuvo ningún efecto sobre la expresión y el estado de fosforilación de pRb ni sobre los niveles de p27 en células controles. Sin embargo, la droga inhibió parcialmente la fosforilación de pRb en linfoblastos de pacientes con EA, como muestra la disminución del contenido de la forma hiperfosforilada de pRb (ppRb) y el aumento de la forma no fosforilada. Simultáneamente, se observó un aumento significativo en el contenido celular de p27.

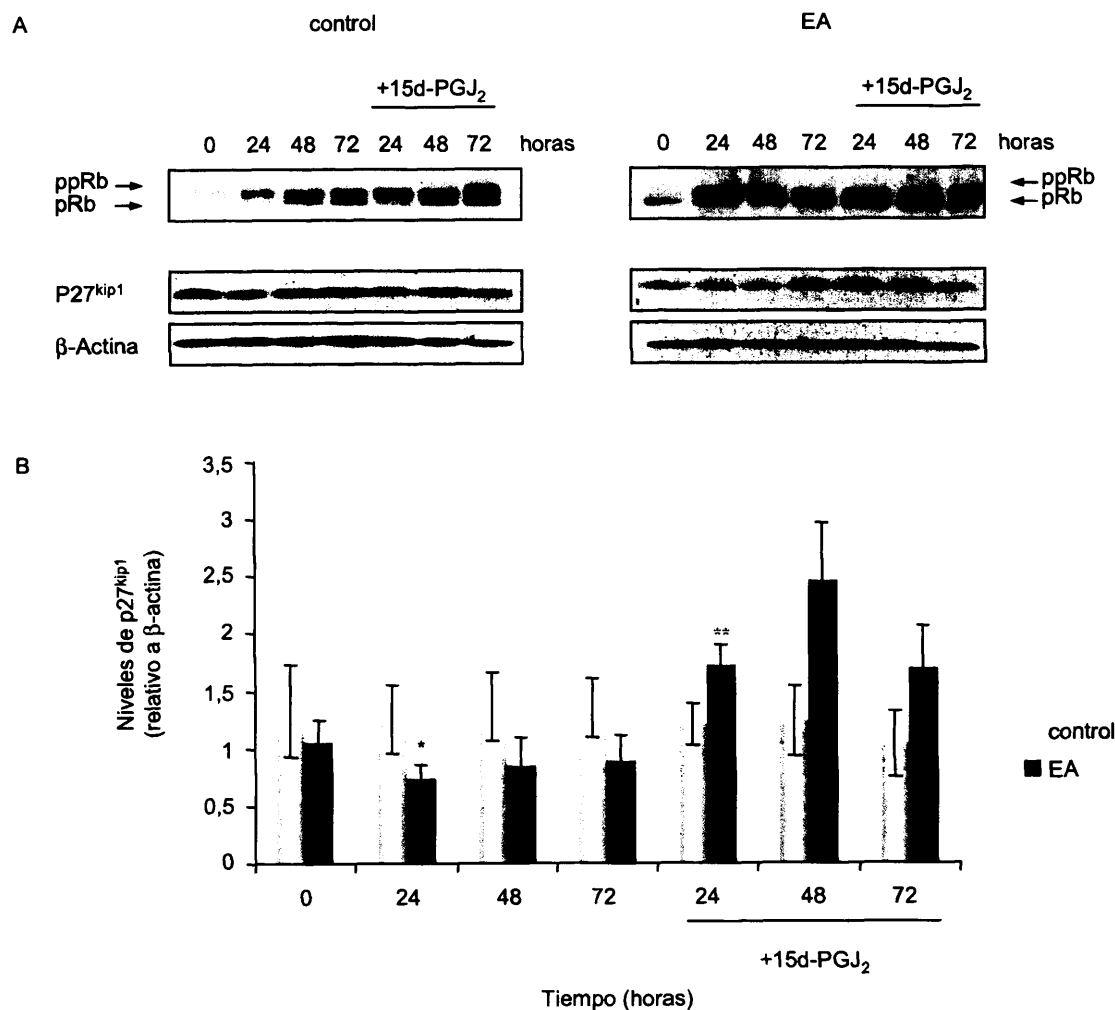


Figura 48. - Efecto de la 15d-PGJ₂ en los niveles de pRb y p27^{kip1} en linfoblastos controles y de EA. Los linfoblastos de individuos controles y de pacientes con EA se cultivaron en medio RPMI con 10% de suero, en presencia o ausencia de 15d-PGJ₂ a 2,5μM, durante 72 h. Tras la siembra se recogieron muestras a las 24, 48 y a las 72 h, para realizar extractos celulares, con los que se realizaron western blots de pRb y p27^{kip1} (panel A). En el panel B, se muestra el análisis densitométrico de p27^{kip1}. Los resultados representados son la media ± el error estándar de cuatro a seis observaciones.*p<0,05 **p<0,02.

4.3. Regulación de los niveles de p27 por 15d-PGJ₂

Para elucidar el efecto de la 15d-PGJ₂ sobre el contenido celular de p27, se analizó, en primer lugar, el efecto de esta droga sobre la vida media de p27. Los resultados obtenidos aparecen recogidos en la figura 49. Puede observarse que la presencia de 15d-PGJ₂ produjo un aumento en la vida media de esta proteína en las células de pacientes de EA, alcanzando valores similares a los de las células controles.

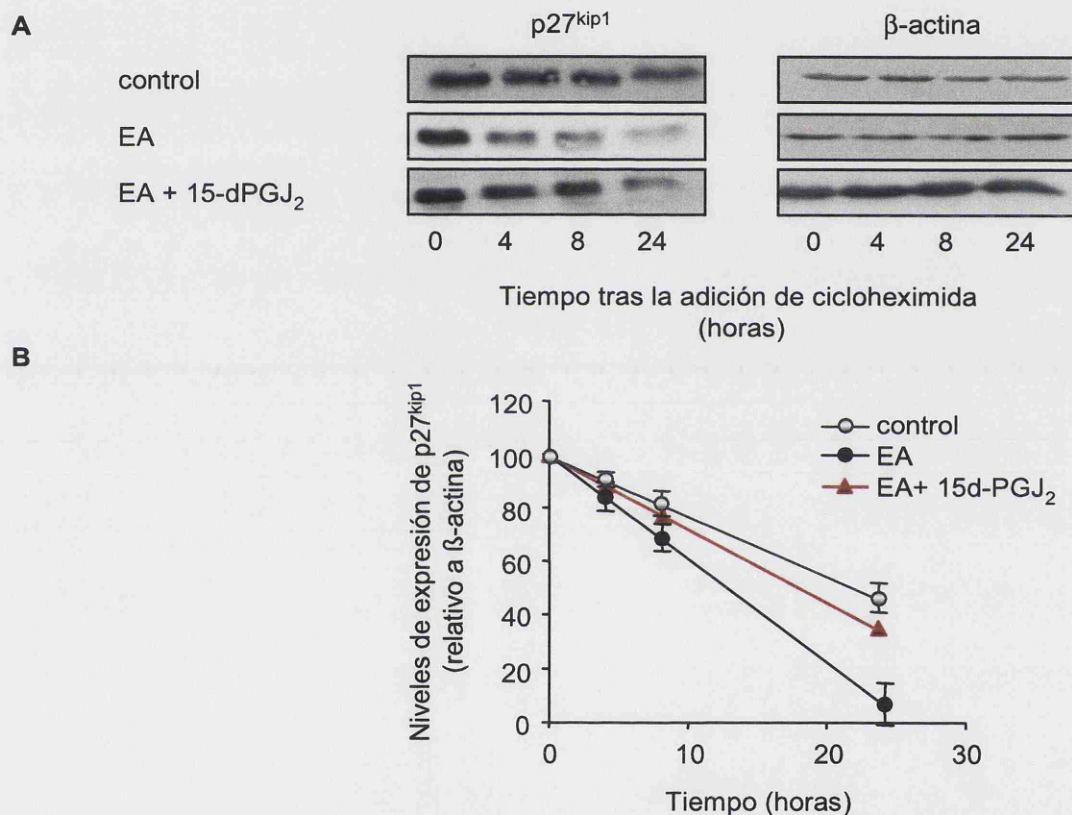


Figura 49.- Vida media de p27 en células de individuos controles y pacientes con EA. Las células se sembraron a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ y se incubaron en RPMI conteniendo 10% de suero en presencia y en ausencia de $2,5 \mu\text{M}$ 15d-PGJ₂. A las 24 h de la siembra, se añadieron $10 \mu\text{g/ml}$ de cicloheximida. Tras la adición, del inhibidor se recogieron muestras del cultivo a las 4, 8 y 24 h, con las que se determinaron los niveles de p27 mediante western blot como se representa en el panel A. En el panel B, se representa el análisis densitométrico de la velocidad de degradación de p27. Los resultados representan la media \pm error estándar de 4 experimentos independientes.

Como era de esperar, la retirada de 15d-PGJ₂ del medio de incubación produjo una disminución progresiva en los niveles de p27 (figura 50). La figura 50 muestra también, que la degradación de p27 es impedida por el inhibidor del proteasoma

MG132. Estos resultados indican que la 15d-PGJ₂ actúa modulando, de alguna manera, la degradación de p27 en el proteasoma.

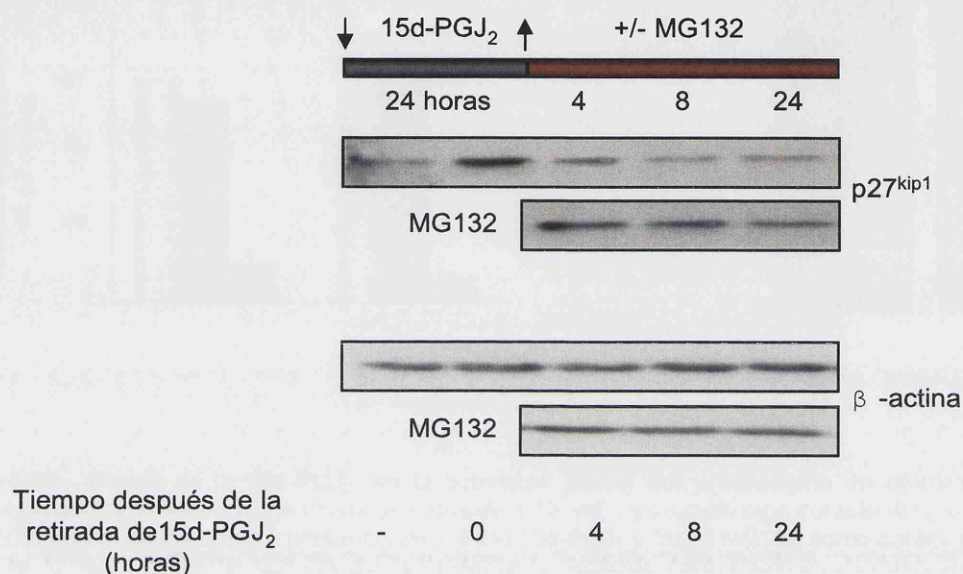


Figura 50.- Análisis comparativo de la degradación de p27, tras el tratamiento con 15d-PGJ₂, en presencia o en ausencia de MG132. Los linfoblastos de individuos con EA se sembraron a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6$ células·ml⁻¹, y se cultivaron durante 24 h, en medio RPMI con 10% suero, en presencia o ausencia de 2,5 μ M 15d-PGJ₂. Posteriormente, se retiró la 15d-PGJ₂ del medio y las células se incubaron en presencia y ausencia de 10 μ M MG132. Los resultados fueron analizados por western blot, como muestra la figura, mediante un experimento representativo.

4.3.1 Efecto de la 15d-PGJ₂ sobre la actividad del proteasoma.

Con el fin de estudiar el efecto de la 15d-PGJ₂ sobre la actividad global del proteasoma, se midió la actividad del proteasoma 26S, evaluando la capacidad de los extractos celulares de degradar el compuesto fluorogénico succinil-Leu-Leu-Val-Tyr 7-amino-4-metilcumarina (Dick y cols., 1997), así como la acumulación de proteínas ubiquitinadas de células con y sin tratamiento procedentes tanto de individuos controles como de EA.

La figura 51 A muestra que la adición de 15d-PGJ₂ no produjo alteración alguna en la actividad global del proteasoma, tanto en células controles como de pacientes de EA. Asimismo, la figura 51 B muestra un patrón idéntico de proteínas ubiquitinadas

en presencia o en ausencia de 15d-PGJ₂ en linfoblastos de individuos control y de pacientes con EA. Como control positivo, se muestran los efectos de MG132.

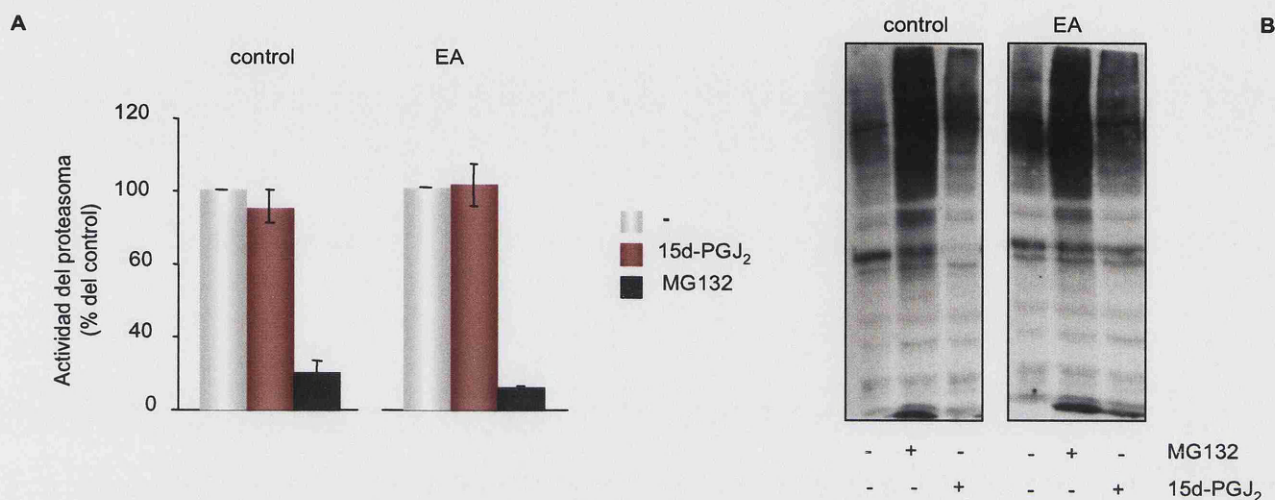


Figura 51.- Efecto de la 15d-PGJ₂ en la actividad global del proteasoma de células de EA. Los linfoblastos se sembraron a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$, y se cultivaron durante 48h, en medio RPMI con 10% suero, en ausencia o presencia de 2,5 μM 15d-PGJ₂ y 10 μM MG132 como control positivo. A las 48h, se tomaron muestras con las que se realizaron extractos para medir la actividad del proteasoma según se describe en métodos. Panel A: Se muestra la media \pm error estándar de seis experimentos diferentes realizados por triplicado. Panel B: se muestra un experimento representativo de un inmunoblotting a las 48h de la estimulación con suero revelado con un anticuerpo anti-ubiquitina.

Dado que p27 tiene que estar fosforilada en el residuo Thr187 para ser reconocida por la proteína Skp2 del complejo ubiquitin ligasa (Dick y cols., 1997), se decidió estudiar el efecto de la 15d-PGJ₂ en los niveles de expresión de Skp2 y en el estado de fosforilación de p27.

La figura 52 muestra que la administración de 15d-PGJ₂ no altera el contenido celular de Skp2 en linfoblastos controles y de EA. Sin embargo, la 15d-PGJ₂ produce una disminución acusada de los niveles de p27 fosforilada en Thr187 en linfoblastos de EA, que se acompaña de un aumento de contenido de p27 en estas células. Por el contrario, la 15d-PGJ₂ no produjo cambios significativos en los linfoblastos de individuos control.

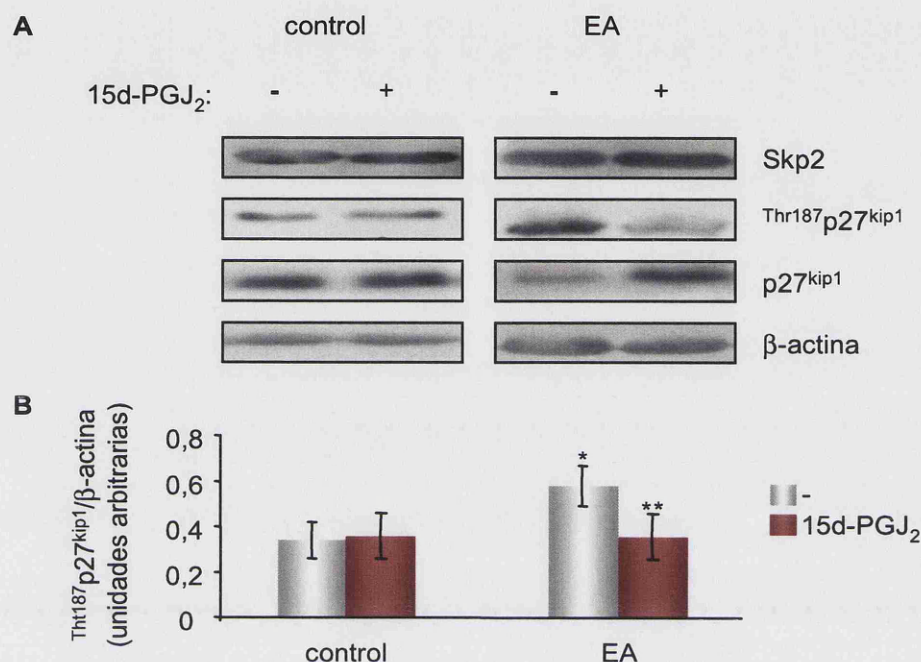


Figura 52.- Efecto del tratamiento con 15d-PGJ₂ sobre los niveles de Skp2, el estado de fosforilación y niveles de expresión de p27^{kip1} en linfoblastos de donantes controles y pacientes con EA. Los linfoblastos se sembraron a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$, incubados en presencia y ausencia de $2,5 \mu\text{M}$ 15d-PGJ₂, en medio RPMI con 10% suero, durante 24 h. Se representan western blots de Skp2, p27^{kip1}, Thr187p27^{kip1} y β-actina (panel A). En el panel B se muestra el análisis densitométrico de Thr187p27^{kip1}, tanto de individuos controles como de EA. Los resultados son la media \pm error estándar de 5 experimentos independientes. * $p < 0,05$ respecto al control, ** $p < 0,05$ respecto a las células de EA incubadas en ausencia de 15d-PGJ₂.

La figura 53 muestra los resultados de una serie de experimentos realizados para determinar la actividad del complejo ciclina E/CDK2, en ausencia o presencia de 15d-PGJ₂. Se observó que, mientras que el tratamiento no modificó la actividad del complejo en células controles, la actividad sí disminuyó en células de pacientes con EA, igualándose a la actividad encontrada en células controles.

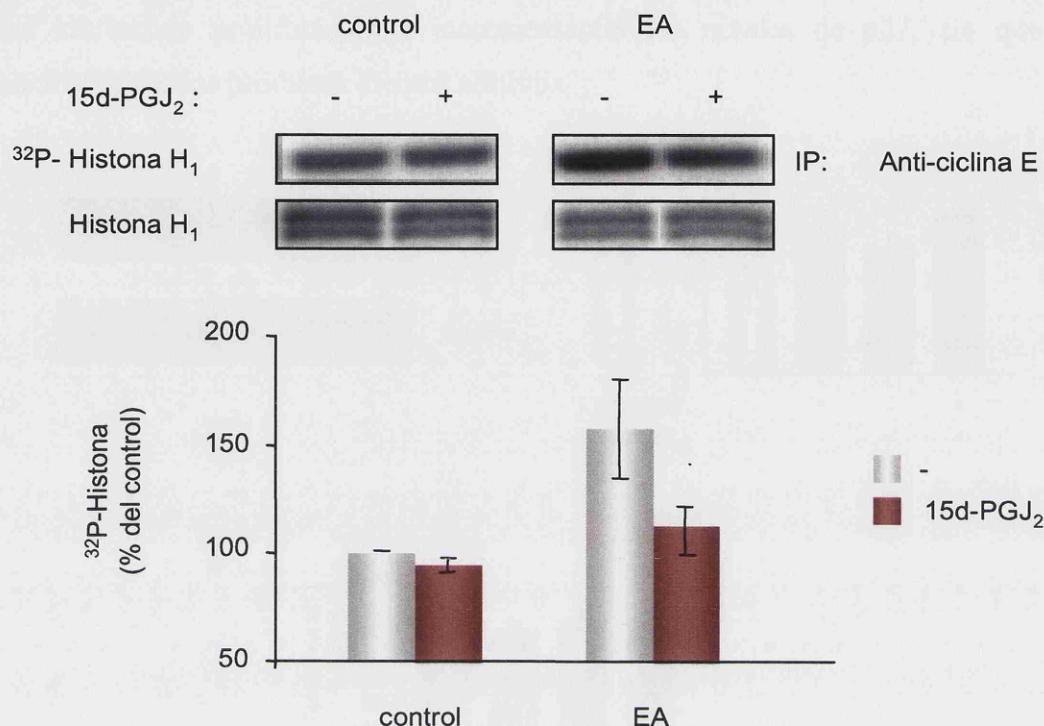


Figura 53.- Actividad quinasa del complejo ciclina E/CDK2 en linfoblastos de donantes controles y pacientes con EA, tras el tratamiento con 15d-PGJ₂. Los linfoblastos se sembraron a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$, y se cultivaron durante 24h en medio RPMI con 10% suero, en presencia y ausencia de $2,5 \mu\text{M}$ 15d-PGJ₂. Se prepararon extractos para ser inmunoprecipitados con anti-ciclina E y la actividad quinasa se midió utilizando histona H1 como sustrato. La histona H1 fosforilada se visualizó mediante autorradiografía. Los niveles de histona H1 se determinaron tiñendo el gel con Comassie. Se muestra un experimento representativo, debajo del cuál esta representado el análisis densitométrico. Los resultados son la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes.

4.4. Efecto de la 15d-PGJ₂ sobre la actividad de PI3-K/Akt.

Como se ha descrito anteriormente, el aumento de proliferación mediado por el suero y la disminución de los niveles de p27 en células de EA requiere la activación de la vía de señalización PI3-K/Akt. Dado que en otros tipos celulares se ha descrito una interacción de la 15d-PGJ₂ con esta vía de señalización (Giri y cols., 2004), parece lógico estudiar si los efectos de 15d-PGJ₂ se ejercen a este nivel. Con este fin, primero se compararon los efectos de la administración de 15d-PGJ₂ y Ly 294002, inhibidor específico de la vía PI3-K/Akt, sobre la proliferación celular y niveles de p27 en células de EA, observando que tanto la 15d-PGJ₂ como el Ly 294002, producen efectos

similares inhibiendo proliferación e incrementando los niveles de p27, sin que la combinación de ambos produzca efectos aditivos.

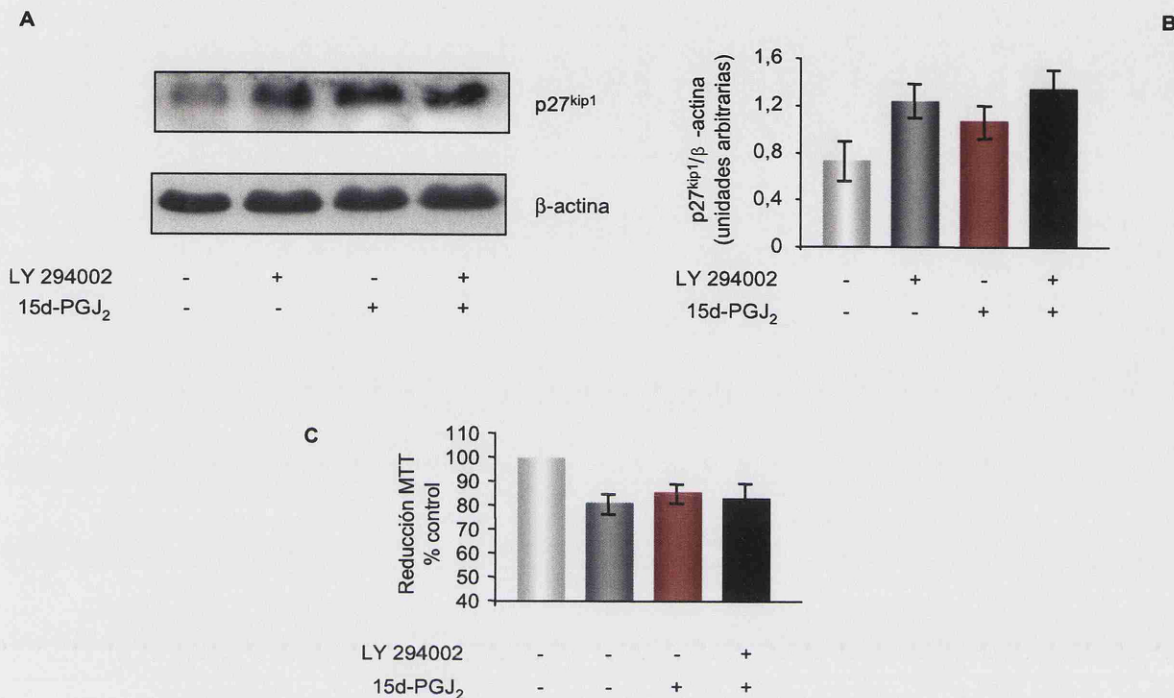


Figura 54.- Influencia de la vía PI3-K/Akt en los efectos de la 15d-PGJ₂ sobre los niveles de p27 y la proliferación celular de linfoblastos de pacientes con EA. Las células se sembraron en medio RPMI con 10% suero a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$, en presencia y en ausencia de 2,5 μM 15d-PGJ₂, 20 μM Ly 294002 o de ambos. A las 24 h, se tomaron muestras para los ensayos de proliferación y de western blotting. En el panel A, se muestra un inmunoblot representativo, mientras que el panel B recoge el análisis densitométrico. Los resultados mostrados son la media \pm error estándar de 4 experimentos. Panel C: La actividad proliferativa se determinó midiendo la reducción de MTT en triplicado en 4 experimentos distintos. Los resultados son la media \pm error estándar de la actividad proliferativa respecto a la basal.

En segundo lugar, se estudiaron los efectos de la 15d-PGJ₂ en la activación de Akt, en linfoblastos de individuos controles y de EA. Para ello, se determinó la fosforilación de Akt en Ser 473 a las 24 h de la estimulación con suero, en presencia y ausencia de 15d-PGJ₂, tanto en linfoblastos de individuos controles como de enfermos. En la figura 55 se observa que la administración de 15d-PGJ₂ no produjo ningún efecto en la activación de Akt, en células controles. Sin embargo, inhibió, parcialmente, la fosforilación de Akt en Ser 473 en linfoblastos de EA, hasta alcanzar niveles similares a los de las células controles.

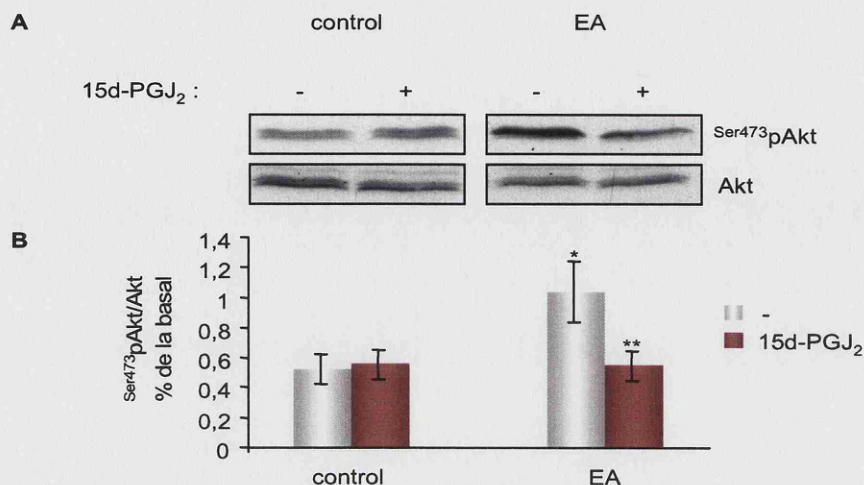


Figura 55.- Activación de la vía PI3-K/Akt en linfoblastos de individuos controles y de pacientes con EA tras el tratamiento con 15d-PGJ₂. Los linfoblastos de individuos controles y de EA ($1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$) fueron privados de suero durante 24 h. La 15d-PGJ₂ ($2,5 \mu\text{M}$) se añadió media hora antes de la estimulación con 10% FBS. 30 min más tarde, se recogieron alícuotas para la determinación por western blot de la actividad de Akt. Panel A: se muestra un experimento representativo. Panel B: análisis densitométrico de la actividad de Akt. Los resultados representan la media \pm error estándar de 8 experimentos independientes. * $p < 0,05$ diferencia significativa respecto a células controles; ** $p < 0,05$ diferencia significativa respecto a células de pacientes de EA incubadas en ausencia de 15d-PGJ₂.

4.5. Efecto de la 9,10 dihidro-15d-PGJ₂ sobre proliferación celular, niveles de p27 y sobre la actividad de PI3-K/Akt.

Se ha sugerido que el anillo de ciclopentenona de 15d-PGJ₂ es importante para desempeñar sus funciones biológicas (Paumi y cols., 2003). El doble enlace entre los carbonos 9-10 de la molécula participa en la formación de aductos con grupos SH de glutatión o de residuo de cisteína en proteínas. Por estas razones, fué interesante explorar si era necesaria la presencia del anillo ciclopentenona para que la 15d-PGJ₂ ejerciera su efecto antiproliferativo, así como para modificar los niveles de p27 y la actividad de Akt. Para este fin se compararon los efectos de 15d-PGJ₂ con el análogo 9,10 dihidro-15d-PGJ₂ que carece del doble enlace entre los C₉-C₁₀, pero retiene la capacidad de activar a PPAR γ (Paumi y cols., 2003). La estructura de estos dos compuestos aparece recogida esquemáticamente en la figura 56.

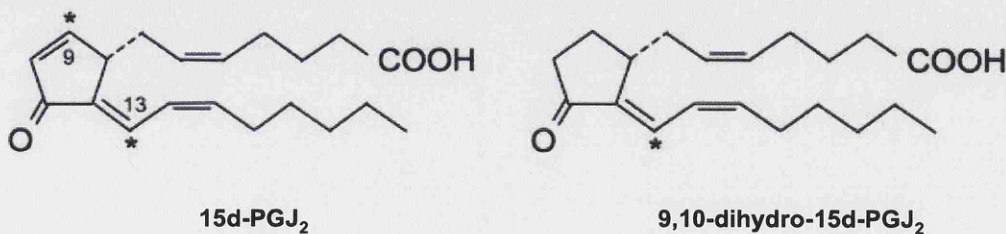


Figura 56.- Estructura de 15d-PGJ₂ y 9,10-dihidro-15d-PGJ₂. * Carbonos electrofilicos.

En la figura 57 se muestra que tras la administración de 9,10 dihidro-15d-PGJ₂ no se produjo ningún efecto sobre actividad proliferativa, ni sobre los niveles de p27 en células controles, pero tampoco sobre linfoblastos de EA, a diferencia de lo observado tras la administración de 15d-PGJ₂.

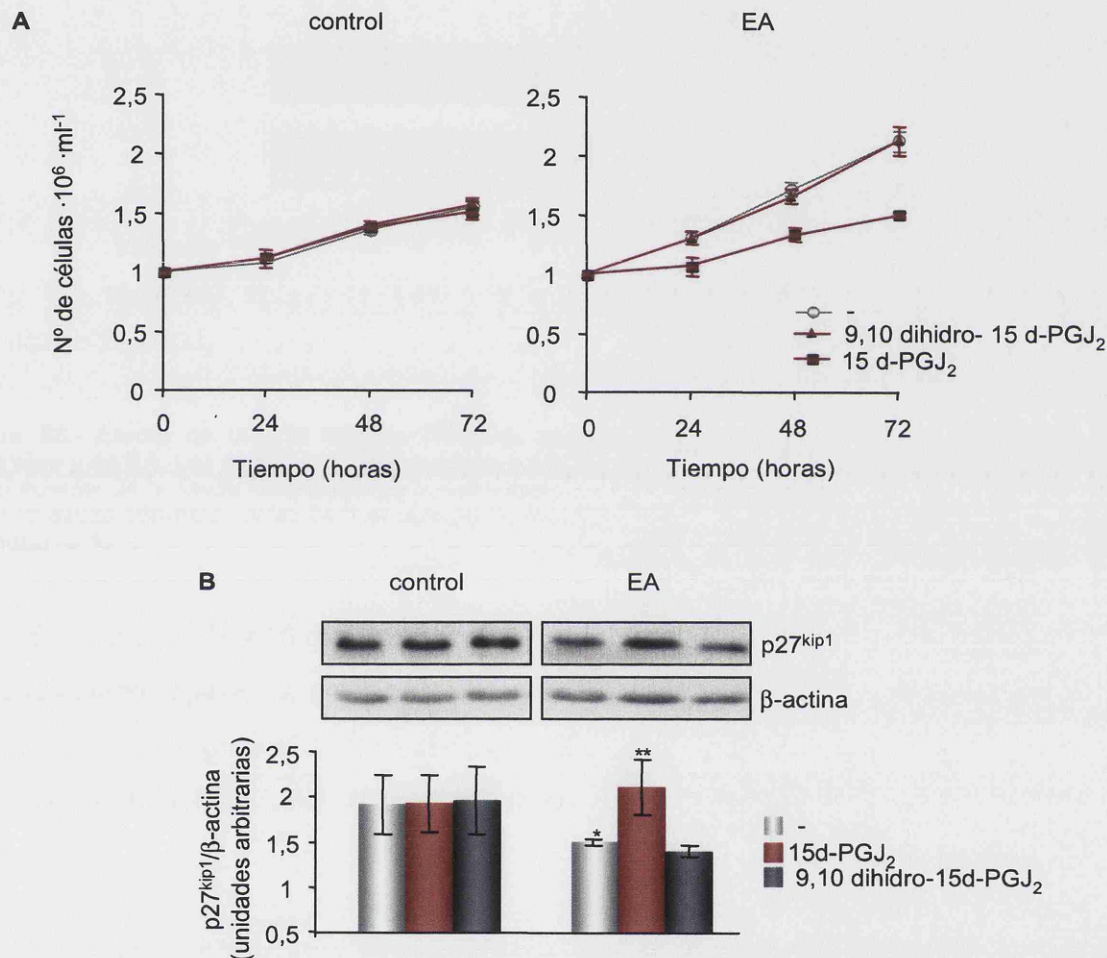


Figura 57.- Efecto de la 9,10 dihidro-15d-PGJ₂ sobre proliferación celular y niveles de p27 en linfoblastos de individuos controles y EA. Los linfoblastos de individuos controles y de pacientes con EA se cultivaron en medio RPMI con 10% de suero, en presencia o ausencia de 15d-PGJ₂ y 9,10 dihidro-15d-PGJ₂ a 2,5 µM, durante 72 h. Cada día del experimento se tomaron muestras para el ensayo de proliferación (panel A). Tras la siembra, se recogieron muestras a las 24 h, para realizar extractos celulares, con los que se realizaron western blots de p27^{kip1} (panel B). Se muestra el análisis densitométrico de p27^{kip1} que representa la media ± error estándar de 3 experimentos independientes. *p<0,05 diferencia significativa con células controles. **p<0,05 con células de EA incubadas en ausencia de 15d-PGJ₂.

También, se observó como se muestra en la figura 58, que el uso de 9,10 dihidro-15d-PGJ₂ no produjo cambios sobre la actividad de PI3-K/Akt ni en linfoblastos de individuos controles ni en EA

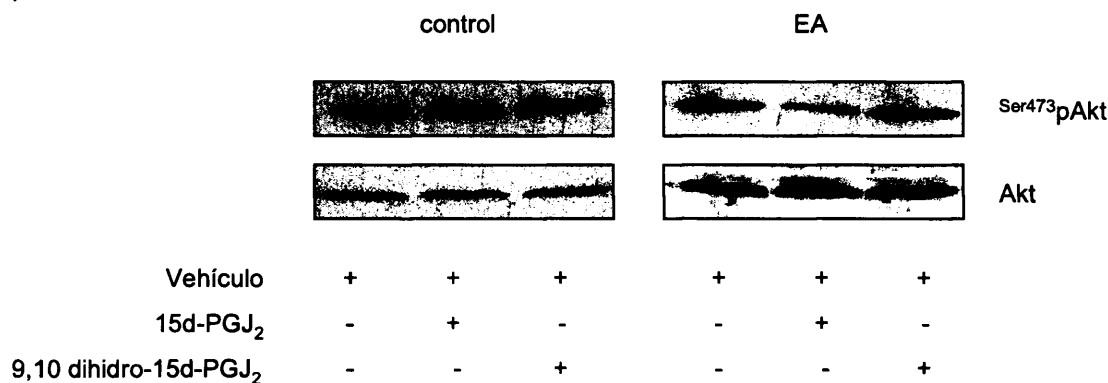


Figura 58.- Efecto de la 9,10 dihidro-15d-PGJ₂ sobre la actividad de PI3-K/Akt de linfoblastos controles y de EA. Los linfoblastos de individuos controles y pacientes de EA ($1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$) se privaron de suero durante 24 h. Media hora antes de la estimulación con 10% FBS se añadió 2,5 μM 15d-PGJ₂ o 2,5 μM 9,10 dihidro-15d-PGJ₂. A las 24 h se recogieron extractos para la determinación por western blot de la actividad de Akt.

Dado que la de 9,10 dihidro-15d-PGJ₂ mantiene la capacidad de unirse al PPAR γ , estos resultados apoyan la independencia de los efectos de la 15d-PGJ₂ en la activación del PPAR γ y la importancia que tiene para sus efectos el doble enlace entre los C₉-C₁₀, sobre la mayor proliferación en respuesta al suero de linfoblastos de pacientes con EA.

DISCUSIÓN

1. Caracterización de las líneas linfoblásticas de EA.

En este trabajo se han utilizado linfocitos inmortalizados con el EBV de pacientes de EA y donantes controles como modelo experimental.

Los linfocitos inmortalizados con el EBV son capaces de proliferar indefinidamente en cultivo. Las líneas linfoblásticas resultantes retienen el fenotipo y la función de las células B maduras (Beatty y cols., 1997), expresando marcadores de activación y moléculas de adhesión similares a las de células B activadas (Wang y cols., 1990).

Existen numerosos precedentes en la literatura que demuestran la utilidad de células extraneurales para el estudio de enfermedades neurológicas (Okada y O'Brien 1969; Gasparini y cols., 1997; Conholly 1998). Se reconoce, hoy en día, que la EA presenta también manifestaciones sistémicas, aunque lógicamente éstas tienen menores repercusiones clínicas (Gibson y Huang 2002; Zhang y cols., 2003; Naderi y cols. 2006). La utilización de tejidos extraneurales de pacientes de Alzheimer ha permitido la identificación de un buen número de alteraciones celulares y moleculares que son reflejo de fenómenos comparables en el cerebro de los individuos afectados (Etcheberrigaray y cols., 1994; Ibarreta y cols., 1998).

Trabajos previos de nuestro laboratorio, pusieron de manifiesto que las líneas linfoblásticas derivadas de pacientes de EA, muestran una respuesta proliferativa al suero, significativamente mayor que las células de individuos no dementes (Urcelay y cols., 2001; Cuevas y cols., 2003, 2005). Esta observación llevó a considerar la posibilidad de que esta respuesta diferencial al suero, pudiera ser un reflejo de las alteraciones de tipo neoplásico que se han detectado en necropsias cerebrales de individuos con EA (Nagy y cols., 1997a y 1997b). El estudio comparativo de los mecanismos que regulan la progresión a través del ciclo de división celular en linfoblastos de individuos controles y pacientes con EA de aparición tardía, ha sido el principal objetivo de esta tesis.

Los resultados aquí presentados confirman y extienden las observaciones previas de nuestro laboratorio indicando una mayor actividad proliferativa de linfoblastos de pacientes de EA en relación a la de linfoblastos de individuos no dementes de edad similar (Urcelay y cols 2001; Cuevas 2003 y 2005). En la literatura, existen precedentes que demuestran cambios en el control del ciclo celular en tejidos extraneurales de pacientes de EA. Así, por ejemplo, cabe destacar el trabajo de Nagy del 2002, realizado en un centenar de pacientes de EA, en el que se muestra que los linfocitos de los pacientes de EA presentan una sensibilidad mayor a los inhibidores de G_1 , como rapamicina (Nagy, 2002). Es interesante destacar que estas alteraciones aparecen también en individuos con deterioro cognitivo leve. También, se han detectado cambios significativos en el control del ciclo celular en fibroblastos de pacientes de EA (Tatebayashi y cols., 1995).

La administración de algunos factores de crecimiento y activadores de receptores de superficie, en presencia de concentraciones bajas de FBS, no permitió identificar ningún receptor que pudiera ser selectivo y significativamente activado en la EA. Por el contrario el uso de inhibidores específicos de las principales vías de señalización celular permitió demostrar la participación de Ca^{2+}/CaM en la mayor respuesta proliferativa al suero de los linfocitos inmortalizados de pacientes de EA. La administración del ligando natural del receptor nuclear $PPAR\gamma$, 15d-PGJ₂ impidió selectivamente el aumento de proliferación de los linfoblastos de EA sin afectar la respuesta proliferativa de las células controles, pero como se discutirá más adelante, los efectos de la ciclopentenona fueron independientes de la activación de $PPAR\gamma$.

Las enfermedades neurodegenerativas humanas, aunque afectan a áreas distintas del cerebro y presentan manifestaciones clínicas diferenciadas, comparten algunas características, como la presencia de agregados de proteínas, aumento del daño oxidativo y alteración de la homeostasis de Ca^{2+} (Calne y Eisen, 1990; Mann y cols., 1997; Troy y cols., 1997). Algunos autores han encontrado evidencias de alteraciones en algunas proteínas relacionadas con el ciclo celular en neuronas de pacientes de varias enfermedades neurodegenerativas (Husseman y cols., 2000). Sin embargo, en este trabajo no se han detectado cambios en la actividad proliferativa ni en el contenido

celular de p27 en linfocitos inmortalizados de pacientes con demencia con cuerpos de Lewy en relación a células de individuos no dementes de edad similar. Aunque no se puede descartar que se produzcan cambios en los niveles de p27 o de otras proteínas relacionadas con el ciclo celular en las neuronas de estos pacientes, estos resultados sugieren que no tendrían una manifestación sistémica. Es interesante destacar las diferencias funcionales entre líneas linfoblásticas de pacientes de EA o de DCLw.

La utilización de líneas linfoblásticas de pacientes de EA o de otras demencias ofrece ventajas comunes a otros modelos celulares en cuanto a disponibilidad de número suficiente de células para experimentación, evitando la extracción repetida de muestras de sangre en una población tan vulnerable como la de ancianos con demencia. No obstante, es importante validar las observaciones realizadas en este modelo experimental, comprobando que se producen observaciones similares en células periféricas no transformadas. Los resultados obtenidos indican que también se produce una mayor respuesta proliferativa en linfocitos de pacientes de EA que en linfocitos controles. El análisis del ciclo celular, tras la estimulación de células mononucleares de sangre periférica con un mitógeno, que activa preferentemente a los linfocitos B (Kuritani y Cooper, 1982), revela un mayor porcentaje de células en las fases S y G₂/M del ciclo celular en las muestras de pacientes de EA. Asimismo, se pudo demostrar alteraciones en el estado de fosforilación y niveles de p27 en linfocitos B similares a los descritos en células inmortalizadas.

2. Alteración en la actividad proliferativa de linfoblastos de pacientes con EA.

Trabajos previos de nuestro laboratorio pusieron de manifiesto un aumento en la actividad proliferativa de linfoblastos de pacientes de Alzheimer, así como una distinta vulnerabilidad a la muerte celular inducida por la ausencia del suero (Cuevas y cols., 2003; 2005, Bartolomé y cols., 2006). Uno de los objetivos de este trabajo fue estudiar los mecanismos moleculares que subyacen en la mayor respuesta proliferativa al suero de linfoblastos de EA. Por esta razón, se realizó, en primer lugar un estudio comparativo de la tasa de proliferación, ciclo celular y niveles de expresión de algunas proteínas reguladoras del ciclo celular en líneas linfoblásticas de individuos controles y de EA.

La acción mitogénica del suero se ejerce mediante la activación de diversos receptores de superficie y a través de vías intracelulares de señalización que últimamente convergen en la maquinaria del ciclo de división celular. La proteína de retinoblastoma (pRb), así como las proteínas p130 y p107, que pertenecen a la misma familia, juegan un papel esencial en la progresión a través de la fase G₁ del ciclo celular, haciendo de intermediarios entre las señales extracelulares y el proceso de transcripción en el núcleo (Weingber, 1995). Cuando pRb se encuentra hipofosforilada forma complejos inhibitorios con factores de transcripción de la familia de E2F (Chellappan y cols., 1991). Tras la fosforilación de pRb se libera E2F permitiendo, de este modo, la transcripción de genes cuyos productos son necesarios para la progresión del ciclo celular (Helin, 1998).

Los resultados que aquí se presentan confirman observaciones previas de nuestro laboratorio, e indican que la pRb es activada en presencia de suero tanto en células controles como en linfoblastos de EA, ya que se observa un aumento en la fosforilación de la proteína en ambos casos.

Los linfoblastos de pacientes con EA muestran un aumento en la expresión y en el estado de fosforilación de pRb. Esta proteína es fosforilada fundamentalmente por el complejo ciclina E/CDK2 (Mittnacht, 1998). En consonancia con la mayor fosforilación de pRb en linfoblastos de pacientes de EA, se encontró en estas líneas celulares un aumento significativo en la actividad de ciclina E/CDK2. Sin embargo, el aumento de actividad no pudo explicarse por diferencias en los niveles de expresión de la ciclina E o de CDK2, entre las líneas control y de EA. La actividad de CDK, que depende sobre todo de la disponibilidad de ciclina y su unión a la quinasa correspondiente (Sherr, 1994), depende también de otros tipos de regulación, como la fosforilación de residuos concretos en la subunidad catalítica de CDK o de la unión de inhibidores de CDKs de bajo peso molecular (Sherr y Roberts, 1995). De acuerdo con observaciones previas, estos resultados muestran que los linfoblastos de pacientes con EA tienen un contenido menor de uno de estos inhibidores de CDKs, concretamente de p27.

El papel biológico de p27 aún no está completamente establecido, aunque distintos estudios le han otorgado un papel relevante en el control del ciclo celular, el cáncer y el desarrollo. Una reducción moderada en la expresión de p27 se considera

suficiente para aumentar el riesgo de cáncer y de aterosclerosis (Porter y cols., 1997; Díez-Juan y Andrés, 2001). Numerosas observaciones realizadas en diversos tipos de células en cultivos, sugieren la existencia de una relación inversa entre abundancia de p27 y estado proliferativo de los cultivos (Rivard y cols., 1996). Así por ejemplo, la depleción de p27 mediante el uso de oligonucleótidos “antisentido”, aumenta la velocidad de proliferación, mientras que la sobreexpresión de p27 inhibe la síntesis de ADN en células del endotelio vascular (Braun-Dullaes y cols., 1999) o en células procedentes de un carcinoma de tiroides (Vitagliano y cols., 2004). De otro lado, los ratones p27^{-/-} son más grandes que los normales y presentan un aumento de las gónadas, adrenales y pituitaria (Fero y cols., 1996). Por otra parte, parece haber una especificidad de tejido con respecto a los niveles de p27; los linfocitos, células de la gónada y neuronas, expresan niveles altos de p27, mientras que el hígado, el riñón y fibroblastos tienen una cantidad relativamente pequeña de esta proteína (Nakayama y cols., 1996). Una característica común de los primeros es que sus células progenitoras son fuertemente mitóticas y tienen un ciclo muy activo, pero más tarde el ciclo se interrumpe. Las células se diferencian y durante este proceso, muchas células son abocadas a la muerte por apoptosis.

La regulación del contenido celular de p27 se realiza por diversos mecanismos, tales como el control transcripcional (Kwon y cols., 1997), la alteración de la traducción (Millard y cols., 1997) y la degradación, dependiente de ubiquitinización, por el proteasoma (Pagano y cols., 1995). Además, también se ha descrito que la molécula de p27 contiene un sitio de reconocimiento de caspasas y puede pues, sufrir un proceso proteolítico por este mecanismo (Frost y cols., 2001).

Los resultados que aquí se presentan muestran que la vida media de p27 es considerablemente menor en linfoblastos de pacientes de Alzheimer 12 h versus 22 h en células controles. En la literatura se ha descrito que la vida media de p27 oscila entre 2 y 44 h, aproximadamente, dependiendo del tipo celular y las condiciones experimentales (Connor y cols., 2003; Vuocolo y cols., 2004). Por otra parte, el hecho de que se haya encontrado un aumento de p27 cuando las células son incubadas en presencia del inhibidor del proteasoma MG132 sugiere que la degradación de p27 en el proteasoma pudiera estar alterada en la EA. De hecho, se han descrito alteraciones la

actividad del proteasoma en cerebros de EA, aunque no se ha podido establecer claramente una relación causal entre este proceso y la muerte neuronal (Checler y cols., 2000; Ding y Keller, 2003). El proteasoma 26S es un complejo multiprotéico, que se encarga de la degradación de un buen número de proteínas reguladoras, controlando ordenada y temporalmente los niveles de las mismas (King y cols., 1996; Naujokat y Hoffman, 2002), así como de la degradación de proteínas con plegamiento defectuoso (Mori, 2000). Este proceso requiere ATP y se inicia mediante la formación de conjugados entre la proteína en cuestión y moléculas de ubiquitina (Coux y cols., 1996). En cerebros de pacientes con EA se han encontrado niveles elevados de una forma mutada de ubiquitina, que aunque puede formar conjugados con distintas proteínas, éstos no son posteriormente susceptibles de proteólisis (Lam y cols., 2000). Asimismo, algunos de los componentes enzimáticos del proteasoma parecen sufrir una mayor oxidación e inactivación en cerebros de EA que en individuos controles, como se deduce de un análisis comparativo por técnicas de proteómica (Castegna y cols., 2002).

La unión de la ubiquitina a la proteína diana es mediada por al menos tres enzimas: enzima activadora de ubiquitina (E1), enzima conjugadora de ubiquitina (E2) y la enzima ubiquitin ligasa (E3) (Scheffner y cols., 1995). La principal responsable del reconocimiento de la proteína diana es la E3. Se piensa que hay dos tipos mayoritarios de ubiquitin ligasa que regulan la progresión a través del ciclo celular. Por un lado la APC/C que es requerida para la separación de las cromátidas hermanas en anafase y salir de la fase M a G₂, mediando la ubiquitinación de mediadores de la anafase como las securinas (pds1 o cut2) y de ciclinas mitóticas respectivamente (Funabiki y cols 1996) y por otro lado el complejo SCF (SKP-Cullin-F-box) que está implicado en la progresión a través de G₁ a S mediando la ubiquitinación de ciclinas e inhibidores de ciclinas importantes en la regulación de esta fase (Feldman y cols., 1997). El complejo SCF está compuesto de componentes invariables como son Skp1, Cul1/Cdc53, y Rbx1 así como una región variable conocida como proteína "F-Box" que es la responsable de unirse por un lado a Skp1 y por otro de reconocer el sustrato que va a ser degradado (Elledge y Harper, 1998; Krek, 1998; Patton y cols., 1998; Deshaies, 1999). Se han descrito un gran número de proteínas "F-Box", que en combinación con la región

invariable así como su interacción con E2 hace que la vía de ubiquitinación sea específica para múltiples sustratos.

Se sabe que la degradación de p27 esta mediada por el complejo SCF^{skp2} (Pagano y cols., 1995), Skp2 es la proteína “F-box” encargada de la degradación de p27 y de ciclina E (Nakayama y cols., 2000), mientras que ciclina E se une directamente a Skp2, p27 necesita estar fosforilada en Thr187 para ser reconocida por Skp2; esta unión resulta en la ubiquitinación y posterior degradación de p27 (Dick y cols., 1997).

A pesar de las alteraciones descritas en la actividad del proteasoma 26S en cerebros de pacientes de EA (de Vrij y cols., 2004), no se encontró diferencias significativas en la actividad global del proteasoma ni en la acumulación de proteínas ubiquitinadas entre las células controles o de EA, que pudieran explicar la disminución en el contenido celular de p27 en los linfoblastos de EA. Tampoco se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de Spk2 entre ambos tipos de células. Por otra parte, no se observaron cambios en la vida media de ciclina E, sustrato también de Skp2, entre las células controles y de EA. En conjunto estos resultados indican que la estimulación de la degradación de p27 observada en los linfoblastos de pacientes de EA no es el resultado de un aumento generalizado de la degradación de proteínas.

Los que aquí se presentan indican que existe una relación inversa entre fosforilación de p27 en Thr187 y contenido celular de p27. Por tanto, la alteración en el proceso de fosforilación de p27, más que diferencias en la actividad del proteasoma, parece ser responsable de la disminución en los niveles celulares de p27 en linfoblastos de pacientes de EA.

La fosforilación de p27 en Thr187 está catalizada por el complejo ciclina E/CDK2 (Sheaff y cols., 1997). Los resultados obtenidos en esta tesis muestran un aumento significativo de la actividad de este complejo en las células de EA en respuesta al suero. La estimulación de la actividad quinasas, inducida por el suero, no parece estar mediada por cambios en los niveles de expresión de ciclina E o de CDK2. Estos resultados sugieren que la disminución en el contenido celular de p27 y la menor presencia de p27

en el núcleo de las células de EA, contribuyen a la estimulación de ciclina E/CDK2, resultando en un aumento de la fosforilación de las proteínas de la familia de retinoblastoma (Cuevas y cols., 2003, 2005; Muñoz y cols., 2005).

3. Papel de la vía de señalización Ca^{2+} /CaM en el control de proliferación de linfoblastos de individuos controles y de EA.

Trabajos previos de nuestro laboratorio, habían demostrado que la regulación a la baja de p27 y la estimulación de la actividad proliferativa de linfoblastos de EA depende de Ca^{2+} /CaM (Cuevas y cols., 2003 y 2005).

A pesar de que se ha descrito que CaM es capaz de interaccionar con la subunidad 26S del proteasoma (Shen y cols., 2005), en este trabajo no se han encontrado evidencias de que los antagonistas de CaM interfieran con la actividad global del proteasoma ni con el proceso de ubiquitinización de las proteínas en linfocitos humanos.

Los resultados aquí presentados indican que la vía Ca^{2+} /CaM interacciona con la cascada de señalización PI3-K/Akt para regular la progresión de las células a través del ciclo de división celular, controlando los procesos de fosforilación y degradación de p27. Esta aseveración se basa en las siguientes observaciones: 1) la fosforilación de Akt es mayor en células de EA en las que se ha descrito un aumento en la actividad de la ruta dependiente de Ca^{2+} /CaM (Ibarreta et al., 1998; Urcelay et al., 2001, Cuevas et al., 2003), 2) el antagonista de CaM, CMZ, aumenta los niveles de p27 en células de EA, y disminuye simultáneamente la fosforilación de p27 en Thr187 y la fosforilación de Akt en Ser473. En consonancia, la vida media de p27 aumenta considerablemente tras el tratamiento de los linfoblastos de EA con CMZ, 3) la inactivación de la vía de señalización PI3-K/Akt por Ly 294002 reproduce el efecto de CMZ incrementando los niveles celulares de p27 y bloquea la estimulación de proliferación, inducida por el suero, en los linfoblastos de pacientes de EA. La inhibición de la ruta PI3-K/Akt muestra el mismo patrón temporal que la disminución de los niveles de fosfo-p27 (Thr187) y el aumento del contenido celular de p27.

La acción de CaM regulando la actividad de PI3-K/Akt y los niveles de p27 no depende de la actividad de CaMKII o de calcineurina, ya que inhibidores selectivos de estas dos enzimas no reproducen los efectos de los antagonistas de CaM impidiendo la fosforilación de Akt y aumentando el contenido celular de p27.

Los antagonistas de CaM no tienen ningún efecto sobre proliferación, fosforilación de Akt o contenido de p27 en linfoblastos de individuos controles. Estos resultados sugieren que debe haber un umbral de CaM por encima del cual, las células adquieren una ventaja proliferativa. Esta idea está en consonancia con evidencias experimentales que indican la existencia de una relación lineal entre la concentración intracelular y/o actividad de CaM y la capacidad proliferativa (Rasmussen y Means, 1989).

En relación al control de los niveles celulares de p27 por PI3-K/Akt, se ha descrito la participación de esta vía de señalización en la regulación de los procesos de transcripción y degradación de p27 (Li y Sun, 1998; Dijkers y cols., 2000; Andreu y cols., 2005).

A nivel transcripcional, algunos laboratorios han demostrado que Akt inhibe la activación de los factores de transcripción conocidos como FoxO1, FoxO3 y FoxO4 mediante la fosforilación de los mismos y su exclusión del núcleo (Kaestner K y cols., 2000; Brownawell y cols., 2001), estos factores de transcripción están involucrados en el control de la expresión de p27 y, por tanto, en la proliferación celular (Coqueret, 2003; Kops y cols., 2000). A nivel postranscripcional, se ha descrito el papel de Akt regulando la expresión de Skp2 e interviniendo directamente en la fosforilación de p27 en diversos residuos (Shin y cols., 2002; Motti y cols 2005).

La fosforilación de p27 en diversos residuos, tiene consecuencias importantes para la estabilización, localización subcelular y degradación de la proteína. Así, por ejemplo, la fosforilación de p27 en Serina 10 (S10), que da cuenta de aproximadamente el 70% de la fosforilación total de la molécula (Ishida y cols., 2000), parece jugar un papel importante en la estabilización de la proteína durante G₀/G₁ (Deng y cols, 2004). Aparentemente, la fosforilación de este residuo promueve el

transporte de p27 desde el núcleo al citoplasma (Rodier y cols., 2001; Boehm y cols., 2002). Aunque aún se discute cuales son las quinasas que fosforilan este residuo *in vivo*, se ha descrito la participación de la hKIS (human kinase interactin stahmin) (Boehm y cols., 2002). Más recientemente, se ha descrito la fosforilación directa de p27 en S10 por Akt purificada, o expresada, transitoriamente, en cultivos celulares (Nacusi y Sheaff, 2006). La fosforilación de p27 por Akt en los residuos Thr157 y Thr198 está bien documentada en numerosos tipos celulares (Viglietto y cols., 2002; Shin y cols., 2002; Liang y cols., 2002; Fujita y cols., 2002; Motti y cols., 2004). Estos residuos se encuentran en la señal de localización nuclear (SLN) en el extremo C-terminal de la molécula (Fujita y cols., 2002; Sekimoto y cols., 2004). Por esta razón, se ha sugerido que Akt regula el transporte de p27 desde el citoplasma hacia el núcleo (Shin y cols., 2002; Motti y cols., 2005; Viglietto y cols., 2002). La fosforilación de estos residuos por Akt, facilita la unión de p27 a la proteína 14.3.3 (Fujita y cols., 2002; Sekimoto y cols., 2004) y previene la unión de p27 a la α -importina inhibiendo la translocación de p27 hacia el núcleo (Liang y cols., 2002). La consecuencia de la retención de p27 en el citoplasma es la activación del complejo ciclina E/CDK2 (Le y cols., 2005). Además, recientemente se ha asignado un papel novel a la fosforilación de p27 en Thr198, regulando la unión de p27 a los complejos ciclina/CDKs, de tal manera que la fosforilación de p27 en Thr198 y Thr187 actuarían sinérgicamente controlando los niveles y actividad de p27 y regulando la transición G₁/S del ciclo celular (Kossatz y cols., 2006).

En las condiciones experimentales de este estudio, la mayor actividad de Akt en los linfoblastos de pacientes de EA se acompaña de un aumento en la actividad del complejo ciclina E/CDK2 y de la fosforilación de p27 en Thr187. Aunque no se ha podido determinar la fosforilación de p27 en Thr157 y Thr198, mediada por Akt, si se ha podido detectar una mayor acumulación de p27 en el citoplasma de las células de pacientes, en relación a las células controles. El secuestro de p27 en el citosol previene la actividad inhibidora de este CDKI y por otra parte aumenta la fosforilación de la proteína en Thr187 y su degradación en el proteasoma.

El mecanismo molecular mediante el cual CaM regula la actividad de PI3-K/Akt no se conoce con precisión. En la literatura, se ha descrito un papel de la vía Ca^{2+} /CaM en la activación de PI3-K/Akt en diversos tipos celulares (Pérez-García y cols., 2004; Cheng y cols., 2003). PI3-K cataliza la reacción que da como productos el fosfatidil inositol 3-4 bifosfato (PIP_2) y fosfatidil inositol 3,4,5 trisfosfato (PIP_3). PIP_2 y PIP_3 se unen a un subgrupo de proteínas, entre las que se encuentra Akt, que contienen dominios plecstrina (PH) de unión a fosfolípidos (Downes y cols., 2005; Wymann y Marone, 2005). Estos fosfolípidos sirven como anclaje de Akt, facilitando su translocación a la membrana plasmática, donde es fosforilada (Song y cols., 2005). Estudios previos, utilizando co-inmunoprecipitación de CaM y PI3-K y cromatografía de afinidad, demostraron que CaM es capaz de asociarse con dominios SH2 de la subunidad reguladora de 85 KDa de PI3-K, aumentando su actividad tanto *in vitro* como en cultivos celulares (Joyal y cols., 1997; Pérez-García y cols., 2004). Además, se ha descrito la existencia de una secuencia consenso de unión a CaM en la subunidad catalítica p110 de PI3-K (Fischer y cols., 1998). Por otro lado, se ha descrito que la disminución de Ca^{2+} intracelular o la inhibición de CaM inhibe la activación de Akt (Egea y cols., 2001; Cheng y cols., 2003; Shin y cols., 2006). La expresión de formas mutantes de CaM en cada uno de los 4 sitios de unión a Ca^{2+} impide la estimulación de Akt por el factor neurotrófico de cerebro (BDNF) (Cheng y cols., 2003). Asimismo, el tratamiento con diferentes antagonistas de CaM no relacionados estructuralmente como la trifluoperacina, el W-13 o el CMZ, es capaz de bloquear la activación de Akt y restaurar la actividad transcripcional de la familia de factores de transcripción FOX en células PTEN^{-/-} (Kau y cols., 2003). Por otra parte, CaM podría activar directamente a Akt, pues se ha descrito recientemente que estas dos proteínas son capaces de formar complejos *in vitro* (Deb y cols., 2004), lo que podría facilitar la translocación de Akt a la membrana plasmática para su fosforilación. Además, Akt es fosforilada directamente por CaM quinasa quinasa (CaM KK), de manera dependiente de Ca^{2+} (Yano y cols., 1998).Cuál de estos mecanismos es el que predomina en linfocitos humanos todavía no lo sabemos, necesitando para ello investigaciones futuras.

La causa de la aparentemente mayor actividad de la ruta dependiente de Ca^{2+} /CaM en linfoblastos de EA se desconoce, pero se han descrito cambios significativos en la homeostasis de Ca^{2+} en estas células (Ibarreta y cols., 1997). Los

iones Ca^{2+} son esenciales en los procesos de aprendizaje y memoria (Mattson y Chan, 2003) y la perturbación de la homeostasis iónica se considera una de las causas de la neurodegeneración en la EA (LaFerla, 2002). CaM es el más importante receptor intracelular de Ca^{2+} . Se ha descrito que CaM juega un papel relevante para la supervivencia, tanto de células neuronales (Egea y cols., 2001; Cheng y cols., 2003), como de células de linfoma de pollo, (Schmalzigaug y cols., 2001) o de carcinoma de mama (Deb y cols., 2004). La importancia de la molécula de CaM para la supervivencia de las células de mamíferos queda reflejada en el hecho de que sea codificada por tres genes en cromosomas separados (Berchtold y cols., 1993) y que su secuencia se ha conservado en el proceso evolutivo, siendo idéntica en distintas especies (Toutenhoofd y Sthrehler, 2000). Aunque no se puede concluir si se producen cambios en la expresión de CaM en células de pacientes, todo induce a pensar que la respuesta exacerbada en los flujos y/o fijación de Ca^{2+} que se produce en linfoblastos de EA (Ibarreta y cols., 1997), sea un factor importante en la actividad exacerbada de la cascada de señalización dependiente de Ca^{2+} /CaM.

Aunque los resultados obtenidos en células extraneurales de pacientes de EA no son directamente extrapolables a lo que sucede en el cerebro, es interesante destacar que alteraciones similares se han detectado en cerebros de pacientes de EA. Así, por ejemplo, se ha relacionado alteraciones en la cascada de señalización PI3-K/Akt con el β -amiloide, los ovillos neurofibrilares y con la pérdida neuronal en EA (Stein y cols., 2002). Se ha detectado un incremento de Akt fosforilada en Ser473 en neuronas de la corteza temporal de EA (Rickle y cols., 2004). La sobreactivación de Akt en cerebros de pacientes con EA está acompañada por un incremento en los niveles de fosforilación de sustratos de Akt como son GSK3 β , mTOR, tau y bajos niveles de p27 (Griffin y cols., 2005). Otros autores han observado un aumento en los niveles de fosfo-p27 (Thr187) en el citoplasma de neuronas vulnerables en la EA en asociación con ovillos neurofibrilares y neuritas distróficas (Ogawa y cols., 2003). Se ha considerado que la sobreactivación de la vía PI3-K/Akt, normalmente asociada al control de la supervivencia celular en cerebros de pacientes con EA, pudiera ser una respuesta de las neuronas para compensar daños provocados por la enfermedad (Marino y cols., 2002). Sin embargo, el incremento de activación de esta vía en neuronas postmitóticas podría,

eventualmente, inducir la muerte celular, como consecuencia de sus efectos en proteínas reguladoras del ciclo celular.

En conjunto, estos resultados, obtenidos en células periféricas de pacientes de EA, disfunción de la vía de señalización PI3-K/Akt, niveles disminuidos de p27, similares a los descritos en neuronas vulnerables del cerebro de pacientes de EA, suponen un apoyo adicional a la hipótesis de que la EA es una enfermedad sistémica (Eckert y cols., 1994; Gibson y Huang 2002; Nagy y cols., 2002). Por otra parte, se infiere que los linfocitos inmortalizados de pacientes de EA son un modelo experimental adecuado para el estudio de perturbaciones funcionales relevantes para la EA.

4. Papel del PPAR γ en el control de proliferación de linfoblastos de individuos controles y de EA.

Los PPAR γ s se describieron inicialmente como receptores nucleares que median los efectos de ciertos compuestos llamados proliferadores de peroxisomas sobre la expresión génica. Como otros receptores nucleares, los PPARs actúan uniéndose a sus elementos de respuesta (PPREs) en los genes diana (Berger y Moller, 2002). Hasta el momento, se han identificado tres tipos: α , β , y γ . El PPAR γ se expresa, fundamentalmente en el tejido adiposo y en el sistema inmune, pero se ha postulado que juega un papel importante en la regulación de la sensibilidad del cerebro a ciertos estímulos (Watson y Craft, 2003). La actividad de este receptor nuclear/factor de transcripción, que forma heterodímeros con el receptor de retinoides (RXR), depende de su unión a ligandos específicos. Se ha descrito una variedad de ligandos sintéticos y naturales para el PPAR γ , entre ellos destacan la ciclopentenona 15d-PGJ $_2$, ligandos hipolipidémicos como los fibratos, los antiinflamatorios no esteroídeos o drogas antidiabéticas como las tiazolidinedionas (glitazonas) como troglitazona, pioglitazona y rosiglitazona (Chinetti y cols., 2000; Satiel y Olefsky, 1996).

El conocimiento de los efectos de la activación de PPAR γ en relación a la EA tiene un considerable interés como potencial farmacológico. En primer lugar, hay que destacar sus efectos antiinflamatorios inhibiendo la liberación de TNF- α e IL1- β y suprimiendo la actividad de COX-2 (ciclooxigenasa-2) y de la forma inducible de la

óxido-nítrico sintasa (iNOS) (Subbaramaiah y cols., 2001; Petrova y cols., 1999). También, en el sistema nervioso se han descrito efectos de la activación de PPAR γ en los astrocitos y la microglía (Kielan y Drew, 2003). La activación de PPAR γ tiene efectos neuroprotectores en cultivos neuronales (Luna-Medina y cols., 2003) y en cerebros de rata (Zhao y cols., 2006). Ya se había mencionado que la inflamación juega un papel relevante en la patogénesis de la EA, que se produce como consecuencia de la activación de astrocitos y microglía y la consecuente liberación de moléculas proinflamatorias. En el tratamiento de la neuroinflamación en la EA, es importante separar los efectos antiinflamatorios de la función fagocítica de la respuesta inmune, ya que, ésta puede tener un papel neuroprotector (Ard y cols., 1996). La activación de PPAR γ parece cumplir esta dualidad y por ello, se propuso utilizar ligandos de PPAR γ como tratamiento para la EA (Gasparini y cols., 2004; Landreth y Heneka, 2001; Feinstein 2003). El descubrimiento de efectos anti-amiloidogénicos y antineoplásicos de ciertos ligandos de PPAR γ supuso un nuevo impulso para la utilización de estas drogas en pacientes de EA (Pasinetti, 2002).

La 15d-PGJ₂ es el ligando natural de PPAR γ , muestra una gran afinidad (K_d=300 μ M) y destaca entre los otros ligandos por su potente efecto antiinflamatorio (Jiang y cols., 1998). Se ha demostrado que aumenta la generación de esta ciclopentenona en el curso de la inflamación (Gilroy y cols., 1999) y se ha propuesto que contribuye a su resolución a través de varios mecanismos (Castrillo y cols., 2000; Rossi y cols., 2000). Además, la 15d-PGJ₂ parece tener efectos neuroprotectores en distintos modelos de enfermedades neurodegenerativas como la ELA o la EA (Klegeris y cols., 2005).

Por otra parte, la 15d-PGJ₂ tiene efectos antimitogénicos y proapoptóticos en numerosos tipos celulares (Han y cols., 2001; Kersten y cols., 2000), por esta razón, pareció interesante considerar la posibilidad de que la ciclopentenona pudiera ejercer sus efectos neuroprotectores actuando también sobre el ciclo celular.

Los resultados aquí presentados muestran que la administración de 15d-PGJ₂ bloquea el aumento de actividad antiproliferativa en respuesta al suero de linfoblastos

con EA. En efecto, se pudo observar que la incubación de células con concentraciones crecientes de 15d-PGJ₂ inhibió el crecimiento celular e indujo apoptosis de manera dosis dependiente. Las células de pacientes con EA fueron más sensibles a la 15d-PGJ₂ que las células controles. A dosis bajas, la 15d-PGJ₂ bloqueó selectivamente el aumento de proliferación en respuesta al suero de linfoblastos de EA, sin alterar la tasa basal normal de proliferación.

Los linfoblastos de individuos controles y de pacientes con EA expresan niveles significativos de PPAR γ y la activación de PPAR γ valorada por la unión ADN-PPAR γ en presencia del ligando, ocurre tanto en las células controles como en las de pacientes con EA. Sin embargo, el efecto antiproliferativo de 15d-PGJ₂ parece ser independiente de la activación del PPAR γ . En primer lugar, antagonistas específicos de PPAR γ como GW9662 y T0070907 no fueron capaces de bloquear el efecto antiproliferativo de la 15d-PGJ₂; en segundo lugar, otros ligandos del PPAR γ tales como tiazolidinedionas, como las rosiglitazonas o los AINEs, como la Indometacina, no reprodujeron los efectos de la 15d-PGJ₂ en las células de pacientes con EA y, en tercer y último lugar, el uso de 9-cis-retinoico no aumentó la inhibición inducida por la 15d-PGJ₂ de los linfoblastos de pacientes con EA cuando las células fueron simultáneamente tratadas con ambos ligandos.

Estos resultados están de acuerdo con otros previos que han descrito efectos de la 15d-PGJ₂ independientes del PPAR γ en otros tipos celulares, incluyendo células del sistema nervioso (Boyault y cols., 2001; Janabi, 2002).

Los resultados presentados muestran que la 15d-PGJ₂ inhibe el aumento de proliferación en respuesta al suero de células de pacientes con EA atenuando la actividad de algunos reguladores claves del ciclo celular que controlan la progresión de G₁ a S. Particularmente, previno el aumento de la actividad del complejo ciclina E/CDK2 y por ende, la fosforilación de pRb en respuesta al suero de las células de EA. Este efecto se acompañó de un incremento en los niveles de inhibidor de CDK, p27.

La adicción de 15d-PGJ₂ no tuvo efectos en la activación del complejo ciclina E/CDK2, ni en el estado de fosforilación de pRb en células controles, pero redujo significativamente la actividad del complejo ciclina E/CDK2 y los niveles de la forma hiperfosforilada de pRb en linfoblastos de pacientes con EA. El tratamiento con 15d-PGJ₂ en las células de pacientes con EA incrementó los niveles de p27, igualándolos a los niveles encontrados en células controles. Estos resultados están en consonancia con trabajos previos que indican que ligandos del PPAR γ inducen la acumulación de p27 en otros tipos celulares (Azuma y cols., 2004; Motomura y cols., 2003).

Los resultados que aquí se presentan indican que el aumento de los niveles de p27 en linfoblastos de EA mediado por la 15d-PGJ₂ se debe a una reducción en la tasa de degradación de p27. La vida media de esta proteína aumentó tras la administración de 15d-PGJ₂, hasta valores similares a los encontrados en células controles. Se han descrito efectos similares de la 15d-PGJ₂, regulando a nivel postranscripcional, los niveles de otras proteínas tales como p53, implicadas en procesos de supervivencia/proliferación celular (Shibata y cols., 2003).

Aunque se ha descrito que la 15d-PGJ₂ tiene efectos electrofílicos y puede interaccionar covalentemente con componentes proteicos del proteasoma (Mullally y cols., 2001; Shibata y cols., 2003; Ishii y cols 2005), no se apreciaron cambios en la actividad del proteasoma ni en la ubiquitinización de proteínas tras el tratamiento con 15d-PGJ₂. Tampoco se encontraron diferencias significativas en los niveles de Skp2 en presencia de 15d-PGJ₂, como se ha descrito en otros tipos celulares, en los que la acción de agonistas de PPAR γ , regulando los niveles celulares de p27, se ha asociado con cambios en la expresión de la proteína receptora del complejo SCF (Koga y cols., 2003).

De forma similar a lo que se observaba con los antagonistas de CaM, la administración de 15d-PGJ₂ a linfoblastos de EA redujo considerablemente la fosforilación de p27 en Thr187, facilitando de este modo la degradación de la proteína en el proteasoma.

Se sabe que la 15d-PGJ₂ modula las vías de señalización MAPK, Ras, Rho y PI3-K/Akt (Takeda y cols., 2001; Chen y Tseng, 2005; Oliva y cols., 2003; Rovin y cols.,

2002; Wakino y cols., 2004), las cuales podrían eventualmente contribuir a la acumulación de p27 (Delmas y cols., 2001), a través de cambios en la fosforilación de la molécula. Como se había mencionado, los resultados han demostrado que la cascada de señalización PI3-K/Akt, pero no la señalización a través de MAP quinasas, está implicada en la mayor respuesta proliferativa de los linfoblastos derivados de pacientes de EA. La activación de Akt controla el estado de fosforilación y la localización subcelular de p27, regulando de esta forma la actividad del complejo ciclina E/CDK2 y el tránsito de las células a través de G₁/S. La administración de 15d-PGJ₂ impide la activación de Akt inducida por el suero en linfoblastos de pacientes de EA, sin afectar la fosforilación de Akt en células controles. Estos resultados sugieren que la 15d-PGJ₂ actúa en un sitio de la cascada de señalización superior a Akt.

La observación de que el análogo de la 15d-PGJ₂, 9,10 dihidro-15-PGJ₂, que carece del anillo ciclopentenona no es capaz de inhibir la actividad proliferativa, ni de inhibir la activación de Akt e incrementar los niveles de p27 en linfoblastos de EA, indica que la presencia del doble enlace entre los carbonos 9-10 es importante para los efectos de la 15d-PGJ₂. Puesto que el análogo 9,10 dihidro-15d-PGJ₂ retiene la capacidad de activar PPAR γ , estas observaciones suponen un apoyo adicional a que los efectos de 15d-PGJ₂ en linfoblastos de pacientes de EA no son mediados por este factor de transcripción. La 9,10 dihidro-15d-PGJ₂ se diseñó como un análogo de 15d-PGJ₂ incapaz de formar conjugados con glutathione (GSH), para estudiar la importancia de los grupos tioles en los efectos de la 15d-PGJ₂ (Paumi, 2003). El hecho de que no tenga efectos en los linfoblastos de pacientes de EA abre la posibilidad de que la distinta sensibilidad a las acciones de la 15d-PGJ₂ entre linfoblastos de EA y donantes controles pudiera deberse, entre otros factores, a cambios en el contenido celular de GSH.

Las ciclopentenonas son compuestos reactivos que poseen un grupo α,β carbonilo no saturado que le permite formar conjugados con los grupos sulfidrilos de los residuos de cisteína en las proteínas y glutathione, modificando de esta forma la función de ciertas proteínas y alterando el estado redox celular (Narumiya y cols., 1987; Parker, 1996). En estas interacciones también participa el doble enlace en la posición 13 (Sánchez-Gómez y cols., 2004). La formación de aductos de Michael entre 15d-PGJ₂ y ciertos

componentes de NF- κ B está bien documentada (Cernuda-Morollón y cols., 2001; Rossi y cols., 2000; Jiang y cols., 1998). Sin embargo, hasta la fecha sólo se ha identificado un número limitado de proteínas modificadas por el tratamiento con 15d-PGJ₂. Entre ellas, destacan algunas proteínas del citoesqueleto y otras reguladas por el estado redox (Stamatakis y cols., 2006).

No hay constancia de que la 15d-PGJ₂ pudiera formar aductos con alguno de los componentes de la cascada de señalización Ca²⁺/CaM/PI3-K/Akt. Sin embargo, se ha descrito la modulación de la cascada de señalización PI3-K/Akt, mediada por H-Ras formando complejos con 15d-PGJ₂ (Oliva y cols., 2003). Otros autores han descrito un efecto inhibitor de 15d-PGJ₂ sobre la actividad de PI3-K/Akt en astrocitos de rata, de manera independiente de la activación de PPAR γ (Giri y cols., 2004). La secuencia de aminoácidos de CaM no contiene residuos de cisteína, pero cabe la posibilidad de que otras proteínas que se unen a CaM, distintas a CaMKII o calcineurina, pudieran ser modificadas por 15d-PGJ₂ y perturbar de esta forma la señalización a través de esta vía. Así, por ejemplo, se ha descrito que CaM interacciona con dominios SH2 de la subunidad p85 de PI3-K siendo esta interacción más fuerte en el dominio SH2 del extremo carboxilo que la encontrada en el dominio amino terminal. Como consecuencia de esta interacción se ha descrito una mayor actividad de PI3-K (Joyal y cols., 1997). El análisis de la secuencia de aminoácidos de la subunidad p85 de PI3-k confirma la existencia de residuos cisteína en el dominio SH2 del extremo carboxi-terminal de la proteína, la unión de la 15d-PGJ₂ a estos residuos podría explicar, tal vez, la menor actividad de la vía PI3-K encontrada en linfoblastos de EA tras el tratamiento con 15d-PGJ₂ sin que se encontrara efecto en células controles. También la molécula de Akt presenta dos cisteínas próximas a los residuos susceptibles de fosforilación importantes para su activación, Cys 310 y Cys 460, próximas a la Thr308 y Ser478 respectivamente.

Las ciclopentenonas no pueden considerarse productos inertes debido a su capacidad de modificar covalentemente ciertas proteínas, sin embargo, el hecho de que la 15d-PGJ₂ no tenga efectos apreciables, a dosis bajas, en linfoblastos de donantes controles, sugiere que su administración no debe producir efectos citotóxicos de importancia.

Aunque los resultados aquí presentados, obtenidos en células extraneurales, no son directamente extrapolables al SNC, la actividad antiproliferativa de la 15d-PGJ₂, regulando los niveles de p27, pudiera tener un efecto neuroprotector impidiendo que las neuronas de las áreas cerebrales vulnerables en la EA, atraviesen el punto crítico G₁/S de control del ciclo celular

CONCLUSIONES

1. Las líneas linfoblásticas de pacientes de EA retienen la capacidad de los linfocitos no transformados de responder más intensamente a la activación mitogénica y de expresar menores niveles de p27^{kip1} que los linfocitos de donantes no dementes de edad aproximada; demostrando la utilidad de linfocitos inmortalizados como modelo experimental para el estudio de perturbaciones funcionales relevantes de la patología de Alzheimer.
2. La perturbación de las interacciones moleculares entre las vías de señalización dependientes de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ y PI3-K/Akt, parece ser responsable de las alteraciones en los procesos de proliferación y regulación del contenido celular de p27 en linfoblastos de pacientes con EA.
3. Los linfocitos de EA muestran una mayor activación de PI3-K/Akt y de ciclina E/CDK2, en respuesta al suero, que se acompaña de cambios recíprocos en los niveles de p27 y de la forma fosforilada de p27 en el residuo Thr187. La adición de antagonistas $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ restaura los niveles celulares de p27, la actividad de PI3-K/Akt y la velocidad de proliferación a niveles similares a los de las células controles.
4. El incremento de fosforilación de p27 en Thr187, observado en linfoblastos de EA, es responsable de la mayor velocidad de degradación de p27 en el proteasoma. La velocidad de recambio de otras proteínas reguladoras del ciclo celular, así como la ubiquitinación de proteínas o la actividad global del proteasoma no se ven afectadas por la enfermedad.
5. El tratamiento de linfoblastos de EA con el ligando de $\text{PPAR}\gamma$, 15d-PGJ₂, previene el aumento de de proliferación y disminución de p27, inducidos por el suero.
6. Los efectos de 15d-PGJ₂ son independientes del $\text{PPAR}\gamma$ y requieren la presencia del doble enlace entre los carbonos 9 y 10 de la molécula. Estos resultados sugieren que la 15d-PGJ₂ podría modificar la actividad de proteínas relevantes formando aductos con grupos sulfidrilos.

7. La 15d-PGJ₂ previene la mayor activación de Akt de linfoblastos de EA, en respuesta al suero, sin afectar a la fosforilación de Akt en las células controles, sugiriendo que actúa en un punto superior de la cascada de señalización.
8. La inhibición de Akt por la 15d-PGJ₂ en linfoblastos de EA previene la fosforilación de p27 e impide la degradación de p27 por el proteasoma.
9. Aunque los resultados presentados en esta tesis, obtenidos en células extraneuronales no son directamente extrapolables al SNC, la actividad antiproliferativa de la 15d-PGJ₂, regulando los niveles de p27, pudiera tener un efecto neuroprotector impidiendo que las neuronas de las áreas cerebrales vulnerables en la EA, atraviesen el punto crítico G₁/S de control del ciclo celular.
10. En conjunto, estas observaciones realizadas en células periféricas de pacientes de EA, disfunción de la vía de señalización PI3-K/Akt, niveles disminuidos de p27, similares a los descritos en neuronas vulnerables del cerebro de pacientes de EA, suponen un apoyo adicional a la hipótesis de que la EA es una enfermedad sistémica.
11. Por último, se piensa que los resultados de esta tesis, obtenidos en células extraneuronales, fácilmente accesibles, aportan algunas claves al estudio de la patogénesis de la EA y podrían, eventualmente, tener interés para el diagnóstico y la búsqueda de dianas terapéuticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Adunsky A, Baram D, Hershkowitz M, Mekori YA. Increased cytosolic free calcium in lymphocytes of Alzheimer patients. *J Neuroimmunol.* 1991 Aug; 33(2):167-72.
- Al-Ubaidi MR, Hollyfield JG, Overbeek PA, Baehr W. Photoreceptor degeneration induced by the expression of simian virus 40 large tumor antigen in the retina of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Feb 15; 89(4):1194-8.
- Alvarez A, Toro R, Caceres A, Maccioni RB. Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett.* 1999 Oct 15; 459(3):421-6.
- Alvarez-Arcaya A, Combarros O, Llorca J, Sanchez-Guerra M, Berciano J, Fernandez-Viadero C, Pena N. The butyrylcholinesterase K variant is a protective factor for sporadic Alzheimer's disease in women. *Acta Neurol Scand.* 2000 Dec; 102(6):350-3.
- Alzheimer, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiat. Psych.-Gerichtl. Med.,* 1907 64, 146–148.
- Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med.* 2004 Jul; 10 Suppl: S18-25.
- Andreu EJ, Lledo E, Poch E, Ivorra C, Albero MP, Martinez-Climent JA, Montiel-Duarte C, Rifon J, Perez-Calvo, Arbona C, Prosper F, Perez-Roger I. BCR-ABL induces the expression of Skp2 through the PI3K pathway to promote p27Kip1 degradation and proliferation of chronic myelogenous leukemia cells. *Cancer Res.* 2005; 65: 3264-3272.
- Anthony RS, McKelvie ND, Cunningham AJ, Craig JI, Rogers SY, Parker AC. Flow cytometry using annexin V can detect early apoptosis in peripheral blood stem cell harvests from patients with leukaemia and lymphoma. *Bone Marrow Transplant.* 1998 Mar; 21(5):441-6.
- Ard MD, Cole GM, Wei J, Mehrle AP, Fratkin JD. Scavenging of Alzheimer's amyloid beta-protein by microglia in culture. *J Neurosci Res.* 1996 Jan 15; 43(2):190-202.
- Arendt T, Rodel L, Gartner U, Holzer M. Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 in Alzheimer's disease. *Neuroreport.* 1996 Nov 25; 7(18):3047-9.
- Arendt T. Alzheimer's disease as a loss of differentiation control in a subset of neurons that retain immature features in the adult brain. *Neurobiol Aging.* 2000 Nov-Dec; 21(6):783-96. Review.
- Arendt T. Synaptic plasticity and cell cycle activation in neurons are alternative effector pathways: the 'Dr. Jekyll and Mr. Hyde concept' of Alzheimer's disease or the yin and yang of neuroplasticity. *Prog Neurobiol.* 2003 Oct; 71(2-3):83-248. Review.

- Arriagada PV, Marzloff K, Hyman BT. Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease. *Neurology*. 1992 Sep; 42(9):1681-8.
- Avila C, Parcet MA, Barros A, Forn C, Mallol R, Gonzalez Darder JM, Feliu Tatay R, Martinez Lozano MD, Campos Hernandez S. [Memory evaluation using functional magnetic resonance: applications in preoperative patients and in Alzheimer s disease] *Rev Neurol*. 2004 Feb 1-15;38(3):284-91. Review.
- Azuma Y, Watanabe K, Date M, Daito M, Ohura K. Induction of proliferation by 15-deoxy-delta12, 14-prostaglandin J2 and the precursors in monocytic leukemia U937 *Pharmacology*. 2004 Aug; 71(4):181-91
- Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 Mar; 3(3):205-14.
- Beatty PR, Krams SM, Martinez OM. Involvement of IL-10 in the autonomous growth of EBV-transformed B cell lines. *J Immunol*. 1997; 158(9):4045-51.
- Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell*. 1994 Jun 17; 77(6):817-27.
- Berchtold MW, Egli R, Rhyner JA, Hameister H, Strehler EE. Localization of the human bona fide calmodulin genes CALM1, CALM2, and CALM3 to chromosomes 14q24-q31, 2p21.1-p21.3, and 19q13.2-q13.3. *Genomics*. 1993 May; 16(2):461-5.
- Berger, J., Moller, D.E. The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med*. 2002; 53: 409– 435.
- Bergmeyer, H.U. 1965. Methods of enzymatic analysis. Academic. Nueva York.
- Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM. Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*. 2005 Mar 3;45(5):675-88.
- Blalock EM, Chen KC, Stromberg AJ, Norris CM, Kadish I, Kraner SD, Porter NM, Landfield PW. Harnessing the power of gene microarrays for the study of brain aging and Alzheimer's disease: statistical reliability and functional correlation. *Ageing Res Rev*. 2005 Nov; 4(4):481-512.
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2006 Jul 29; 368(9533):387-403.
- Blessed G, Tomlinson BE, Roth M. The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br J Psychiatry*. 1968 Jul; 114(512):797-811.

- Blum-Degen D, Frolich L, Hoyer S, Riederer P. Altered regulation of brain glucose metabolism as a cause of neurodegenerative disorders? *J Neural Transm Suppl.* 1995; 46:139-47.
- Boehm M, Yoshimoto T, Crook MF, Nallamshetty S, True A, Nabel GJ, Nabel EGA growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27(Kip1) and regulates cell cycle progression *EMBO J.* 2002 Jul;21(13):3390-401.
- Bondy B, Hofmann M, Muller-Spahn F, Witzko M, Hock C. The PHA-induced calcium signal in lymphocytes is altered after blockade of K(+) -channels in Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res.* 1996 May-Jun; 30(3):217-27.
- Borg JP, Ooi J, Levy E, Margolis B The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein. *Mol Cell Biol.* 1996 Nov; 16(11):6229-41.
- Bornemann KD, Wiederhold KH, Pauli C, Ermini F, Stalder M, Schnell L, Sommer B, Jucker M, Staufenbiel M. Abeta-induced inflammatory processes in microglia cells of APP23 transgenic mice. *Am J Pathol.* 2001 Jan; 158(1):63-73.
- Boyault, S., Simonin, M.A., Bianchi, A., Compe, E., Liagre, B., Mainard, D., Becuwe, P., Dauca, M., Netter, P., Terlain, B., Bordji, K. 15-Deoxy-delta12,14-PGJ2, but not troglitazone, modulates IL-1beta effects in human chondrocytes by inhibiting NF-kappaB and AP-1 activation pathways. *FEBS Lett.* 2001; 501: 24– 30.
- Braak H, Braak E. Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl.* 1996; 165:3-12.
- Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Ziegler A, von der Leyen HE, Dzau VJ. A novel role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Clin Invest.* 1999 Sep;104(6):815-23
- Breitner, J.C. The role of antiinflammatory drugs in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Med.* 1996. 47,401-411.
- Brookmeyer R, Gray S, Kawas C. Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *Am J Public Health.* 1998 Sep; 88(9):1337-42.
- Brownawell AM, Kops GJPL, Macara IG, Burgering BMT. the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 3534-3546.
- Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders . *Brain Res Brain Res Rev.* 2000 Aug; 33(1):95-130.

- Bullido MJ, Artiga MJ, Recuero M, Sastre I, Garcia MA, Aldudo J, Lendon C, Han SW, Morris JC, Frank A, Vazquez J, Goate A, Valdivieso F. A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nat Genet.* 1998 Jan; 18(1):69-71.
- Busser J, Geldmacher DS, Herrup K. Ectopic cell cycle proteins predict the sites of neuronal cell death in Alzheimer's disease brain. *J Neurosci* 1998;18(8):2801-7.
- Butterfield DA, Hensley K, Harris M, Mattson M, Carney J. beta-Amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence-specific fashion: implications to Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Apr 29;200(2):710-5
- Butterfield, D.A., Stadtman E.R. Protein oxidation processes in aging brain. *Adv. Cell Aging Gerontol.* 1997; 2: 161-191.
- Cacabelos R, Alvarez XA, Franco-Maside A, Fernandez-Novoa L, Caamano J. Serum tumor necrosis factor (TNF) in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1994 Jan-Feb;16(1):29-35.
- Calne DB, Eisen A. Parkinson's disease, motoneuron disease and Alzheimer's disease: origins and interrelationship. *Adv Neurol.* 1990; 53:355-60.
- Casadesus G, Puig ER, Webber KM, Atwood CS, Escuer MC, Bowen RL, Perry G, Smith MA. Targeting gonadotropins: an alternative option for Alzheimer disease treatment. *J Biomed Biotechnol.* 2006; 2006(3):39508.
- Castegna A, Aksenov M, Aksenova M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, Booze R, Markesbery WR, Butterfield DA. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Radic Biol Med.* 2002 Aug 15; 33(4):562-71.
- Castellani R, Hirai K, Aliev G, Drew KL, Nunomura A, Takeda A, Cash AD, Obrenovich ME, Perry G, Smith MA. Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 2002 Nov 1;70(3):357-60. Review.
- Castrillo A, Diaz-Guerra MJ, Hortelano S, Martin-Sanz P, Bosca L. Inhibition of IkappaB kinase and IkappaB phosphorylation by 15-deoxy-Delta (12, 14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages. *Mol Cell Biol.* 2000 Mar; 20(5):1692-1698.
- Cernuda-Morollon E, Pineda-Molina E, Canada FJ, Perez-Sala D. 15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 inhibition of NF-kappaB-DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J Biol Chem.* 2001 Sep 21; 276(38):35530-35536.
- Check E. Related Nerve inflammation halts trial for Alzheimer's drug. *Nature.* 2002 Jan 31; 415(6871):462.

- Checler F, da Costa CA, Ancolio K, Chevallier N, Lopez-Perez E, Marambaud P. Role of the proteasome in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Jul; 1502 (1):133-8.
- Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*. 1991 Jun; 65(6):1053-61.
- Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*. 1991 Jun 14; 65(6):1053-61.
- Chen KS, Masliah E, Grajeda H, Guido T, Huang J, Khan K, Motter R, Soriano F, Games D. Neurodegenerative Alzheimer-like pathology in PDAPP 717V-->F transgenic mice. *Prog Brain Res*. 1998;117:327-34
- Chen X, Lowe M, Keyomarsi K. UCN-01-mediated G1 arrest in normal but not tumor breast cells is pRb-dependent and p53-independent. *Oncogene*. 1999 Oct 7; 18(41):5691-702.
- Chen Y, Liu W, McPhie DL, Hassinger L, Neve RL. APP-BP1 mediates APP-induced apoptosis and DNA synthesis and is increased in Alzheimer's disease brain. *J Cell Biol*. 2003 Oct 13; 163(1):27-33.
- Chen Y, McPhie DL, Hirschberg J, Neve RL. The amyloid precursor protein-binding protein APP-BP1 drives the cell cycle through the S-M checkpoint and causes apoptosis in neurons. *J Biol Chem*. 2000 Mar 24; 275(12):8929-35.
- Chen ZY, Tseng CC. 15-deoxy-Delta12,14 prostaglandin J2 up-regulates Kruppel-like factor 4 expression independently of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by activating the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase signal transduction pathway in HT-29 colon cancer cells. *Mol Pharmacol*. 2005;68(5):1203-1213
- Cheng A, Wang S, Yang D, Xiao R, Mattson MP. Calmodulin mediates brain-derived neurotrophic factor cell survival signaling upstream of Akt kinase in embryonic neocortical neurons. *J Biol Chem*. 2003 Feb 28; 278(9):7591-9.
- Cheng A, Wang S, Yang D, Xiao R, Mattson MP. Calmodulin mediates brain-derived neurotrophic factor cell survival signaling upstream of Akt kinase in embryonic neocortical neurons. *J Biol Chem*. 2003 Feb 28; 278(9):7591-9.
- Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res*. 2000 Oct; 49(10):497-505. Review.
- Chittajallu R, Alford S, Collingridge GL. Ca^{2+} and synaptic plasticity. *Cell Calcium*. 1998 Nov-Dec; 24(5-6):377-85. Review.

- Chow N, Korenberg JR, Chen XN, Neve RL. APP-BP1, a novel protein that binds to the carboxyl-terminal region of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem*. 1996 May 10; 271(19):11339-46.
- Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 1998 Nov; 55(11):1449-55.
- Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 1998 Nov; 55(11):1449-55.
- Claycomb JM, Benasutti M, Bosco G, Fenger DD, Orr-Weaver TL. Gene amplification as a developmental strategy: isolation of two developmental amplicons in *Drosophila*. *Dev Cell*. 2004 Jan; 6(1):145-55.
- Colangelo V, Schurr J, Ball MJ, Pelaez RP, Bazan NG, Lukiw WJ. Gene expression profiling of 12633 genes in Alzheimer hippocampal CA1: transcription and neurotrophic factor down-regulation and up-regulation of apoptotic and pro-inflammatory signaling. *J Neurosci Res*. 2002 Nov 1; 70(3):462-73.
- Connor B, Beilharz EJ, Williams C, Synek B, Gluckman PD, Faull RL, Dragunow M. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) immunoreactivity in the Alzheimer's disease temporal cortex and hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*. 1997 Oct 3; 49(1-2):283-90.
- Connor MK, Kotchetkov R, Cariou S, Resch A, Lupetti R, Beniston RG, Melchior F, Hengst L, Slingerland JM. CRM1/Ran-mediated nuclear export of p27(Kip1) involves a nuclear export signal and links p27 export and proteolysis. *Mol Biol Cell*. 2003 Jan; 14(1):201-13.
- Copani A, Uberti D, Sortino MA, Bruno V, Nicoletti F, Memo M. Activation of cell-cycle-associated proteins in neuronal death: a mandatory or dispensable path? *Trends Neurosci* 2001; 24(1):25-31.
- Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol* 2003; 13: 65-70.
- Correas I, Diaz-Nido J, Avila J. Microtubule-associated protein tau is phosphorylated by protein kinase C on its tubulin binding domain. *J Biol Chem*. 1992 Aug 5; 267(22):15721-8.
- Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem*. 1996; 65:801-47.
- Cuevas N, Muñoz U, Hermida OG, Martín-Requero A. Altered transcriptional regulators in response to serum in immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease

patients. *Neurobiol Aging*. 2005;26(5):615-24.

- Cuevas N, Urcelay E, Hermida OG, Saíz-Díaz R, Bermejo F, Ayuso MS, Martín-Requero A. Ca(2+)/calmodulin-dependent modulation of cell cycle elements pRb and p27(kip1) involved in the enhanced proliferation of lymphoblasts from patients with Alzheimer dementia. *Neurobiol Dis* 2003; 13(3):254-63.
- Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*. 1976 Dec 25;2(8000):1403.
- de Silva HA, Aronson JK, Grahame-Smith DG, Jobst KA, Smith AD. Abnormal function of potassium channels in platelets of patients with Alzheimer's disease. *Lancet*. 1998 Nov 14; 352(9140):1590-3.
- de Vrij FM, Fischer DF, van Leeuwen FW, Hol EM. Protein quality control in Alzheimer's disease by the ubiquitin proteasome system. *Prog Neurobiol*. 2004 Dec; 74(5):249-70.
- Deb TB, Coticchia CM, Dickson RB. Calmodulin-mediated activation of Akt regulates survival of c-Myc-overexpressing mouse mammary carcinoma cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 38903-38911.
- DeKosky ST. [Neurobiology and molecular biology of Alzheimer's disease] *Rev Neurol*. 2002 Oct 16-31; 35(8):752-60. Review.
- Delmas C, Manenti S, Boudjelal A, Peyssonnaud C, Eychene A, Darbon JM. The p42/p44 mitogen-activated protein kinase activation triggers p27Kip1 degradation independently of CDK2/cyclin E in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem*. 2001; 276(37):34958-34965.
- Deng X, Mercer SE, Shah S, Ewton DZ, Friedman E. The cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is stabilized in G (0) by Mirk/dyrk1B kinase. *J Biol Chem*. 2004 May; 279(21):22498-504.
- Denver RJ, Ouellet L, Furling D, Kobayashi A, Fujii-Kuriyama Y, Puymirat J. Basic transcription element-binding protein (BTEB) is a thyroid hormone-regulated gene in the developing central nervous system. Evidence for a role in neurite outgrowth. *J Biol Chem*. 1999 Aug 13; 274(33):23128-34.
- Deshaies RJ. SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1999; 15:435-67.
- Dick LR, Cruikshank AA, Destree AT, Grenier L, McCormack TA, Melandri FD, Nunes SL, Palombella VJ, Parent LA, Plamondon L, Stein RL. Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin in cultured cells. *J Biol Chem*. 1997. 272(1):182-8.

- Díez-Juan A, Andrés V. The growth suppressor p27 (Kip1) protects against diet-induced atherosclerosis. *FASEB J.* 2001 Sep; 15(11):1989-95.
- Dijkers PF, Medema RH, Pals C, Banerji L, Thomas NS, Burgering BM, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ. Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). *pMol Cell Biol.* 2000; 20:9138-9148
- Ding Q, Keller JN. Does proteasome inhibition play a role in mediating neuropathology and neuron death in Alzheimer's disease?. *J Alzheimers Dis.* 2003 Jun;5(3):241-5.
- Downes CP, Gray A, Lucocq JM. Probing phosphoinositide functions in signaling and membrane trafficking. *Trends Cell Biol.* 2005. 15: 259–268
- Drewes G, Lichtenberg-Kraag B, Doring F, Mandelkow EM, Biernat J, Goris J, Doree M, Mandelkow E. Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J.* 1992 Jun;11(6):2131-8.
- Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 1995. 92(17):7686-9.
- Eckert A, Hartmann H, Forstl H, Muller WE. Alterations of intracellular calcium regulation during aging and Alzheimer's disease in nonneuronal cells. *Life Sci.* 1994; 55(25-26):2019-29. Review.
- Eckert A, Marques CA, Keil U, Schussel K, Muller WE. Increased apoptotic cell death in sporadic and genetic Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Dec; 1010:604-9. Review.
- Eckert A, Schindowski K, Leutner S, Luckhaus C, Touchet N, Czech C, Müller WE. Alzheimer's disease-like alterations in peripheral cells from presenilin-1 transgenic mice. *Neurobiol Dis* 2001a; 8(2):331-42.
- Eckert A, Steiner B, Marques C, Leutz S, Romig H, Haass C, Muller WE. Elevated vulnerability to oxidative stress-induced cell death and activation of caspase-3 by the Swedish amyloid precursor protein mutation. *J Neurosci Res.* 2001b Apr 15;64(2):183-92.
- Egea J, Espinet C, Soler RM, Dolcet X, Yuste VJ, Encinas M, Iglesias M, Rocamora N, Comella JX. Neuronal survival induced by neurotrophins requires calmodulin. *J Cell Biol.* 2001 Aug 6; 154(3):585-9.
- Eikelenboom P, Stam FC. Immunoglobulins and complement factors in senile plaques. An immunoperoxidase study. *Acta Neuropathol (Berl).* 1982; 57(2-3):239-42.

- Elledge SJ, Harper JW. The role of protein stability in the cell cycle and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Apr;1377(2):M61-70.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 1998 Nov; 4(11):1313-7.
- Etcheberrigaray R, Ibarreta D. Ionic channels and second messenger alterations in Alzheimer's disease. Relevance of studies in nonneuronal cells. *Rev Neurol*. 2001 Oct 16-31; 33(8):740-9. Review.
- Etcheberrigaray R, Ito E, Kim CS, Alkon DL. Soluble beta-amyloid induction of Alzheimer's phenotype for human fibroblast K⁺ channels. *Science*. 1994 Apr; 264(5156):276-9.
- Evans DB, Rank KB, Bhattacharya K, Thomsen DR, Gurney ME, Sharma SK. Tau phosphorylation at serine 396 and serine 404 by human recombinant tau protein kinase II inhibits tau's ability to promote microtubule assembly. *J Biol Chem*. 2000 Aug 11; 275(32):24977-83.
- Feddersen RM, Ehlenfeldt R, Yunis WS, Clark HB, Orr HT. Disrupted cerebellar cortical development and progressive degeneration of Purkinje cells in SV40 T antigen transgenic mice. *Neuron*. 1992 Nov;9(5):955-66.
- Feinstein DL. Therapeutic potential of peroxisome proliferator-activated receptor agonists for neurological disease. *Diabetes Technol Ther*. 2003;5(1):67-73.
- Feldman RM, Correll CC, Kaplan KB, Deshaies RJ. A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell*. 1997 Oct; 91(2):221-30.
- Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE, Firpo E, Polyak K, Tsai LH, Broudy V, Perlmutter RM, Kaushansky K, Roberts JM. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27 (Kip1)-deficient mice. *Cell*. 1996 May; 85(5):733-44.
- Ferrer I, Pozas E, Ballabriga J, Planas AM. Strong c-Jun/AP-1 immunoreactivity is restricted to apoptotic cells following intracerebral ibotenic acid injection in developing rats. *Neurosci Res*. 1997 May; 28(1):21-31.
- Finckh U. The future of genetic association studies in Alzheimer disease. *J Neural Transm*. 2003 Mar; 110(3):253-66. Review.
- Fischer R, Julsgart J, Berchtold MW. High affinity calmodulin target sequence in the signalling molecule PI 3-kinase. *FEBS Lett*. 1998 Mar 20; 425(1):175-7.
- Fisher A, Pittel Z, Haring R, Bar-Ner N, Kliger-Spatz M, Natan N, Egozi I, Sonogo H, Marcovitch I, Brandeis R. M1 muscarinic agonists can modulate some of the

- hallmarks in Alzheimer's disease: implications in future therapy. *J Mol Neurosci.* 2003; 20(3):349-56.
- Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell.* 1995 Dec 1; 83(5):803-12.
 - Frade JM. Unscheduled re-entry into the cell cycle induced by NGF precedes cell death in nascent retinal neurones. *J Cell Sci.* 2000 Apr; 113 (Pt 7):1139-48.
 - Fratiglioni L, Launer LJ, Andersen K, Breteler MM, Copeland JR, Dartigues JF, Lobo A, Martinez-Lage J, Soininen H, Hofman A. Incidence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology.* 2000; 54(11 Suppl 5):S10-5.
 - Frost V, Delikat S, Al-Mehairi S, Sinclair AJ. Regulation of p27^{KIP1} in Epstein-Barr virus-immortalized lymphoblastoid cell lines involves non-apoptotic caspase cleavage. *J Gen Virol.* 2001 Dec; 82(Pt 12):3057-66.
 - Fujita N, Sato SK, Katayama K, Tsuruo T. Akt-dependent phosphorylation of p27Kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *J Biol Chem.* 2002 Aug 9; 277(32):28706-13. Epub 2002 May 31
 - Funabiki H, Kumada K, Yanagida M. Fission yeast Cut1 and Cut2 are essential for sister chromatid separation, concentrate along the metaphase spindle and form large complexes. *EMBO J.* 1996 Dec 2; 15(23):6617-28.
 - Gasparini L, Racchi M, Binetti G, Trabucchi M, Solerte SB, Alkon D, et al. Peripheral markers in testing pathophysiological hypotheses and diagnosing Alzheimer's disease. *FASEB J* 1998;12:17-34
 - Gasparini L, Ongini E, Wenk G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Alzheimer's disease: old and new mechanisms of action. *J Neurochem.* 2004 Nov; 91(3):521-536
 - Gibson G, Martins R, Blass J, Gandy S. Altered oxidation and Signal transduction systems in fibroblasts from Alzheimer patients. *Life Sci* 1996; 59:477-89.
 - Gibson GE, Huang HM. Oxidative processes in the brain and non-neuronal tissues as biomarkers of Alzheimer's disease. *Front Biosci.* 2002; 7:d1007-15. Review.
 - Gibson GE, Huang HM. Oxidative processes in the brain and non-neuronal tissues as biomarkers of Alzheimer's disease. *Front Biosci.* 2002 Apr; 7:d1007-15. Review.
 - Gibson GE, Sheu KF, Blass JP. Abnormalities of mitochondrial enzymes in Alzheimer disease. *J Neural Transm.* 1998; 105(8-9):855-70. Review.

- Gibson GE. Interactions of oxidative stress with cellular calcium dynamics and glucose metabolism in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 2002 Jun 1; 32(11):1061-70. Review.
- Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M.J. Willoughby, D.A. Inducible cyclooxygenase may have antiinflammatory properties. *Nat. Med.* 1999; 5: 698– 701
- Giovanni A, Wirtz-Brugger F, Keramaris E, Slack R, Park DS. Involvement of cell cycle elements, cyclin-dependent kinases, pRb, and E2F x DP, in B-amyloid-induced neuronal death. *J Biol Chem.* 1999 Jul 2;274(27):19011-6.
- Giri, S., Rattan, R., Singh, A.K., y Singh I. The 15-Deoxy- δ 12, 14-Prostaglandin J₂ Inhibits the Inflammatory Response in Primary Rat Astrocytes via Down-Regulating Multiple Steps in Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt-NF- κ B-p300 Pathway Independent of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ 1. *The Journal of Immunology* 2004. 173, 5196–5208.
- Gladkevich A, Kauffman HF, Korf J. Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2004 May; 28(3):559-76.
- Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 May 16; 120(3):885-90.
- Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 May 16; 120(3):885-90.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature.* 1991 Feb 21; 349(6311):704-6.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature.* 1991 Feb 21; 349(6311):704-6.
- Goedert M, Hasegawa M, Jakes R, Lawler S, Cuenda A, Cohen P. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Lett.* 1997 Jun 2; 409(1):57-62.
- Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA. Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron.* 1992 Jan; 8(1):159-68.

- Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA. Tau proteins and neurofibrillary degeneration. *Brain Pathol.* 1991 Jul; 1(4):279-86.
- Gómez-Isla T, Hyman BT: Connections, cognition and cognitive impairment in Alzheimer's disease. Springer-Verlag, 1997; 149-166.
- Gómez-Pinilla F, Cummings BJ, Cotman CW. Induction of basic fibroblast growth factor in Alzheimer's disease pathology. *NeuroReport* 1990; 1(3-4):211-4.
- Gouras GK, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F, Greenfield JP, Haroutunian V, Buxbaum JD, Xu H, Greengard P, Relkin NR. Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am J Pathol.* 2000 Jan;156(1):15-20
- Govoni S, Gasparini L, Racchi M, Trabucchi M. Peripheral cells as an investigational tool for Alzheimer's disease. *Life Sci.* 1996; 59:461-8.
- Grana X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene.* 1995 Jul 20; 11(2):211-9.
- Griffin RJ, Moloney A, Kelliher M, Johnston JA, Ravid R, Dockery P, O'Connor R, O'Neill C. Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *J Neurochem* 2005; 93: 105-117.
- Grimaldi LM, Casadei VM, Ferri C, Veglia F, Licastro F, Annoni G, Biunno I, De Bellis G, Sorbi S, Mariani C, Canal N, Griffin WS, Franceschi M. Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1alpha gene polymorphism. *Ann Neurol.* 2000 Mar; 47(3):361-5.
- Gunther EC, von Bartheld CS, Goodman LJ, Johnson JE, Bothwell M. The G-protein inhibitor, pertussis toxin, inhibits the secretion of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience.* 2000; 100(3):569-79.
- Guo Q, Fu W, Holtsberg FW, Steiner SM, Mattson MP. Superoxide mediates the cell-death-enhancing action of presenilin-1 mutations. *J Neurosci Res.* 1999 Jun 1; 56(5):457-70.
- Guo Q, Sopher BL, Furukawa K, Pham DG, Robinson N, Martin GM, Mattson M.P. Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid beta-peptide: involvement of calcium and oxyradicals. *J Neurosci* 1997; 17(11):4212-22.
- Han, S.W., Greene, M.E., Pitts, J., Wada, R.K., Sidell, N. Novel expression and function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human neuroblastoma cells. *Clin. Cancer* 2001; 7, 98-104.

- Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH. Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett*. 1992 Nov 23; 147(1):58-62.
- Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 1991 Oct; 12(10):383-8.
- Hardy J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*. 1997 Apr; 20(4):154-9. Review.
- Heintz N. Cell death and the cell cycle: a relationship between transformation and neurodegeneration? *Trends Biochem Sci*. 1993 May; 18(5):157-9.
- Helin K. Regulation of cell proliferation by the E₂F transcription factors. *Curr Opin Genet Dev*. 1998 Feb; 8(1):28-35. Review.
- Herrup K, Neve R, Ackerman SL, Copani A. Divide and die: cell cycle events as triggers of nerve cell death. *J Neurosci*. 2004 Oct 20; 24(42):9232-9.
- Himmler A. Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Mol Cell Biol*. 1989 Apr; 9(4):1389-96.
- Hirokawa N, Shiomura Y, Okabe S. Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol*. 1988 Oct; 107(4):1449-59.
- Hock BJ Jr, Lamb BT. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Trends Genet*. 2001 Oct; 17(10):S7-12.
- Hock C, Konietzko U, Papassotiropoulos A, Wollmer A, Streffer J, von Rotz RC, Davey G, Moritz E, Nitsch RM. Generation of antibodies specific for beta-amyloid by vaccination of patients with Alzheimer disease. *Nat Med*. 2002 Nov; 8(11):1270-5.
- Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, Wright K, Saad I, Mueller R, Morgan D, Sanders S, Zehr C, O'Campo K, Hardy J, Prada CM, Eckman C, Yonkin S, Hsiao K, Duff K. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med*. 1998 Jan; 4(1):97-100.
- Huang H-M, Martins R, Gandy S, Etcheberrigaray R, Ito E, Alkon DL, Blass J, Gibson G. Use of cultured fibroblasts in elucidating the pathophysiology and diagnosis of Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 1994; 747:225-43.
- Huberman M, Shalit F, Roth-Deri I, Gutman B, Brodie C, Kott E, Sredni B. Correlation of cytokine secretion by mononuclear cells of Alzheimer patients and their disease stage. *J Neuroimmunol*. 1994 Jul; 52(2):147-52.

- Husseman JW, Nochlin D, Vincent I. Mitotic activation: a convergent mechanism for a cohort of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging*. 2000 Nov-Dec;21(6):815-28.
- Ibarreta D, Urcelay E, Parrilla R, Ayuso MS. Distinct pH homeostatic features in lymphoblasts from Alzheimer's disease patients. *Ann Neurol*. 1998 Aug; 44(2):216-22.
- Ibarreta, D., Parrilla, R., and Ayuso, M.S. Altered Ca²⁺ homeostasis in lymphoblasts from patients with late-onset Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 1997. 11(4):220-7.
- Imahori K, Uchida T. Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease. *J Biochem (Tokyo)*. 1997 Feb; 121(2):179-88.
- in't Veld, B.A., Ruitenber, A., Hofman, A., Launer, L.J., Van Duijn, C.M, Stijnen, T., Breteler, M.M and Stricker, B.H. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med*. 2001. 345, 1515-1521.
- Inomata H, Nakamura Y, Hayakawa A, Takata H, Suzuki T, Miyazawa K, Kitamura N. A scaffold protein JIP-1b enhances amyloid precursor protein phosphorylation by JNK and its association with kinesin light chain 1. *J Biol Chem*. 2003 Jun 20; 278(25):22946-55.
- Ishida N, Kitagawa M, Hatakeyama S, Nakayama K. Phosphorylation at serine 10, a major phosphorylation site of p27(Kip1), increases its protein stability. *J Biol Chem*. 2000. 275(33):25146-54.
- Ishiguro K, Omori A, Takamatsu M, Sato K, Arioka M, Uchida T, Imahori K. Phosphorylation sites on tau by tau protein kinase I, a bovine derived kinase generating an epitope of paired helical filaments. *Neurosci Lett*. 1992 Dec 14; 148(1-2):202-6.
- Ishihara T, Hong M, Zhang B, Nakagawa Y, Lee MK, Trojanowski JQ, Lee VM. Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron*. 1999 Nov;24(3):751-62.
- Ishii T, Sakurai T, Usami H, Uchida K. Oxidative modification of proteasome: identification of an oxidation-sensitive subunit in 26 S proteasoma. *Biochemistry*. 2005;44(42):13893-901
- Ishizawa T, Sahara N, Ishiguro K, Kersh J, McGowan E, Lewis J, Hutton M, Dickson DW, Yen SH. Co-localization of glycogen synthase kinase-3 with neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in transgenic mice. *Am J Pathol*. 2003 Sep; 163(3):1057-67.
- Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Watanabe K, Sekiguchi M, Hosoki E, Kawashima-Morishima M, Lee HJ, Hama E, Sekine-Aizawa Y, Saido TC. Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med*. 2000 Feb; 6(2):143-50.

- Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*. 1994 Jul; 13(1):45-53.
- Janabi, N. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 expression by 15-deoxy-Delta(12,14)(12,14)-prostaglandin J(2) in activated human astrocytes, but not in human brain macrophages. *J. Immunol*. 2002; 168: 4747-4755
- Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Chishti MA, Horne P, Heslin D, French J, Mount HT, Nixon RA, Mercken M, Bergeron C, Fraser PE, St George-Hyslop P, Westaway D. A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature*. 2000 Dec 21-28; 408(6815):979-82.
- Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr. The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 Sep 24; 695:144-8. Review.
- Jellinger KA. Challenges in neuronal apoptosis. *Curr Alzheimer Res*. 2006 Sep; 3(4):377-91.
- Jiang, C., Ting, A.T. and Seed, B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998. 391, 82-86.
- Jong YJ, Dalemar LR, Seehra K, Baenziger NL. Bradykinin receptor modulation in cellular models of aging and Alzheimer's disease. *Int Immunopharmacol* 2002; 2:1833-40.
- Jordan-Sciutto K, Rhodes J, Bowser R. Altered subcellular distribution of transcriptional regulators in response to A beta peptide and during Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev*. 2001 Dec; 123(1):11-20.
- Joyal JL, Burks DJ, Pons S, Matter WF, Vlahos CJ, White MF, Sacks DB. Calmodulin activates phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*. 1997 Nov 7; 272(45):28183-6.
- Julien JP, Mushynski WE. Neurofilaments in health and disease. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1998; 61:1-23. Review.
- Jung SS, Nalbantoglu J, Cashman NR. Alzheimer's beta-amyloid precursor protein is expressed on the surface of immediately ex vivo brain cells: a flow cytometric study. *J Neurosci Res*. 1996 Nov 1; 46(3):336-48.
- Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev*. 2000 Jan; 14(2):142-6.

- Kaku M, Tsutsui K, Motokawa M, Kawata T, Fujita T, Kohno S, Tohma Y, Ohtani J, Tenjoh K, Tanne K. Amyloid beta protein deposition and neuron loss in osteopetrotic (op/op) mice. *Brain Res Brain Res Protoc*. 2003 Oct; 12(2):104-8.
- Kalman J, Palotas A, Kis G, Boda K, Turi P, Bari F, Domoki F, Doda I, Argyelan M, Vincze G, Sera T, Csernay L, Janka Z, Pavics L. Gene expression profile analysis of lymphocytes from Alzheimer's patients *Psychiatr Genet*. 2005 Mar; 15(1):1-6.
- Kaltschmidt B, Uherek M, Volk B, Baeuerle PA, Kaltschmidt C. Transcription factor NF-kappaB is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Mar 18; 94(6):2642-7.
- Kammesheidt A, Boyce FM, Spanoyannis AF, Cummings BJ, Ortegon M, Cotman C, Vaught JL, Neve RL. Deposition of beta/A4 immunoreactivity and neuronal pathology in transgenic mice expressing the carboxyl-terminal fragment of the Alzheimer amyloid precursor in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Nov 15; 89(22):10857-61.
- Kaneko I, Yamada N, Sakuraba Y, Kamenosono M, Tutumi S. Suppression of mitochondrial succinate dehydrogenase, a primary target of beta-amyloid, and its derivative racemized at Ser residue. *J Neurochem*. 1995 Dec; 65(6):2585-93.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. 1987 Feb 19-25; 325(6106):733-6.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. 1987 Feb 19-25; 325(6106):733-6.
- Kau TR, Schroeder F, Ramaswamy S, Wojciechowski CL, Zhao JJ, Roberts TM, Clardy J, Sellers WR, Silver, PA. A chemical genetic screen identifies inhibitors of regulated nuclear export of a Forkhead transcription factor in PTEN-deficient tumor cells. *Cancer Cell*. 2003 Dec; 4(6):463-76.
- Keller JN, Kindy MS, Holtsberg FW, St Clair DK, Yen HC, Germeyer A, Steiner SM, Bruce-Keller AJ, Hutchins JB, Mattson MP. Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J Neurosci*. 1998 Jan 15; 18(2):687-97.
- Kermer P, Liman J, Weishaupt JH, Bahr M. Neuronal apoptosis in neurodegenerative diseases: from basic research to clinical application. *Neurodegener Dis*. 2004; 1(1):9-19.

- Kersten, S., Desvergne, B., Wahli, W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 2000; 405: 421–424.
- Kidd M. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature*. 1963 Jan 12; 197:192-3.
- Kielian T, Drew PD. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists on central nervous system inflammation. *J Neurosci Res*. 2003;71(3):315-325
- King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW. How proteolysis drives the cell cycle. *Science*. 1996 Dec 6; 274(5293):1652-9. Review.
- Kirazov E, Kirazov L, Bigl V, Schliebs R. Ontogenetic changes in protein level of amyloid precursor protein (APP) in growth cones and synaptosomes from rat brain and prenatal expression pattern of APP mRNA isoforms in developing rat embryo. *Int J Dev Neurosci*. 2001 Jun; 19(3):287-96.
- Kitamura, Y., Shimohama, S., Koike, H., Kakimura, J., Matsuoka, Y., Nomura, Y., Gebicke-haerter, P.J. and Taniguchi, T. Increased expression of cyclooxygenases and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in Alzheimer's disease brains. *Biochim. Biophys. Res. Commun*. 1999. 254, 582-586.
- Klegeris A, McGeer PL. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and other anti-inflammatory agents in the treatment of neurodegenerative disease *Curr Alzheimer Res*. 2005 Jul; 2(3):355-365
- Klein JA, Ackerman SL. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J Clin Invest*. 2003 Mar; 111(6):785-93. Review.
- Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT, Ackerman SL. The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature*. 2002 Sep 26; 419(6905):367-74.
- Kliewer, S.A., Umesono, K., Noonan, D.J., Heyman R.A. and Evans, R.M. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathway through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 1992. 358, 771-777.
- Knockaert M, Greengard P, Meijer L. Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol Sci*. 2002 Sep; 23(9):417-25. Review.
- Koga H, Harada M, Ohtsubo M, Shishido S, Kumemura H, Hanada S, Taniguchi E, Yamashita K, Kumashiro R, Ueno T, Sata M Troglitazone induces p27Kip1-associated cell-cycle arrest through down-regulating Skp2 in human hepatoma cells. *Hepatology*. 2003; 37(5):1086-1096.
- Koistinen P. Human peripheral blood and bone marrow cell separation using density gradient centrifugation on Lymphoprep and Percoll in haematological diseases. *Scand J Clin Lab Invest* 1987; 47(7):709-14.

- Kossatz U, Vervoorts J, Nicleit I, Sundberg HA, Arthur JS, Manns MP, Malek NP. C-terminal phosphorylation controls the stability and function of p27kip1. *EMBO J*. 2006 Nov;25(21):5159-70
- Krek W. Proteolysis and the G1-S transition: the SCF connection. *Curr Opin Genet Dev*. 1998 Feb;8(1):36-42
- Krishan A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol*. 1975 Jul; 66(1):188-93.
- Kuan CY, Schloemer AJ, Lu A, Burns KA, Weng WL, Williams MT, Strauss KI, Vorhees CV, Flavell RA, Davis RJ, Sharp FR, Rakic P. Hypoxia-ischemia induces DNA synthesis without cell proliferation in dying neurons in adult rodent brain. *J Neurosci*. 2004 Nov 24; 24(47):10763-72.
- Kumahara E, Ebihara T, Saffen D. Protein kinase inhibitor H7 blocks the induction of immediate-early genes *zif268* and *c-fos* by a mechanism unrelated to inhibition of protein kinase C but possibly related to inhibition of phosphorylation of RNA polymerase II. *J Biol Chem*. 1999 Apr 9; 274(15):10430-8.
- Kuritani T, Cooper MD. Human B cell differentiation. III. Enhancing effect of monoclonal anti-immunoglobulin D antibody on pokeweed mitogen-induced plasma cell differentiation. *J Immunol*. 1982 Dec; 129(6):2490-5.
- Kwon TK, Buchholz MA, Ponsalle P, Chrest FJ, Nordin AA. The regulation of p27Kip1 expression following the polyclonal activation of murine G₀ T cells. *J Immunol*. 1997 Jun; 158(12):5642-8.
- LaFerla FM. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2002 Nov; 3(11):862-72. Review.
- Lam YA, Pickart CM, Alban A, Landon M, Jamieson C, Ramage R, Mayer RJ, Layfield R. Inhibition of the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Aug 29; 97(18):9902-6.
- Landreth GE, Heneka MT. Anti-inflammatory actions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2001 Nov-Dec; 22(6):937-944
- Le Quan Sang KH, Mignot E, Gilbert JC, Huguet R, Aquino JP, Regnier O, Devynck MA. Platelet cytosolic free-calcium concentration is increased in aging and Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 1993 Mar 1; 33(5):391-3.
- Le XF, Pruefer F, Bast RC Jr. HER2-targeting antibodies modulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 via multiple signaling pathways. *Cell Cycle*. 2005 Jan; 4(1):87-95.

- Lee EW, Oh W, Song J. Jab1 as a mediator of nuclear export and cytoplasmic degradation of p53. *Mol Cells*. 2006. 22(2):133-40.
- Lee EY, Chang CY, Hu N, Wang YC, Lai CC, Herrup K, Lee WH, Bradley A. Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature*. 1992 Sep 24; 359(6393):288-94.
- Lee VM, Balin BJ, Otvos L Jr, Trojanowski JQ. A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science*. 1991 Feb 8;251(4994):675-8.
- Lee, G., Elwood, F., McNally, J., Weiszmann, J., Lindstrom, M., Amaral, K., Nakamura, M., Miao, S., Cao, P., Learned, R.M., Chen, J.L., Li, Y. T0070907, a selective ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma, functions as an antagonist of biochemical and cellular activities. *J. Biol. Chem*. 2002. 277, 19649–19657.
- Leesnitzer, L.M., Parks, D.J., Bledsoe, R.K., Cobb, J.E., Collins, J.L., Consler, T.G., Davis, R.G., Hull-Ryde, E.A., Lenhard, J.M., Patel, L., Plunket, K.D., Senk, J.L., Stimmel, J.B., Therapontos, C., Willson, T.M., Blanchard, S.G. Functional consequences of cysteine modifications in the ligand binding sites of peroxisome proliferators activated receptors by GW9662. *Biochemistry* 2002. 41, 6640–6650.
- Lehmann, J.M., Lenhard, J.M., Oliver, B.B., Ringold, G.M. and Kliewer, S.A. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Biol. Chem*. 1997. 272, 3406-3411.
- Lemere CA, Blusztajn JK, Yamaguchi H, Wisniewski T, Saido TC, Selkoe DJ. Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiol Dis*. 1996 Feb;3(1):16-32.
- Levites Y, Das P, Price RW, Rochette MJ, Kostura LA, McGowan EM, Murphy MP, Golde TE. Anti-Abeta(42)- and anti-Abeta(40)-specific mAbs attenuate amyloid deposition in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 2006; 116:193–201
- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 1995a Aug 18; 269(5226):973-7.
- Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KA, Weber JL, Bird TD, Schellenberg GD. A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science*. 1995b Aug 18;269(5226):970-3.
- Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E. Enhanced

neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science*. 2001 Aug 24; 293(5534):1487-91.

- Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, Paul Murphy M, Baker M, Yu X, Duff K, Hardy J, Corral A, Lin WL, Yen SH, Dickson DW, Davies P, Hutton M. Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet*. 2000 Aug; 25(4):402-5.
- Li DM, Sun H. PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998. 95:15406-15411.
- Li M, Smith CP. Beta-amyloid1-40 inhibits electrically stimulated release of [3H]norepinephrine and enhances the internal calcium response to low potassium in rat cortex: prevention with a free radical scavenger. *Brain Res Bull*. 1996;39(5):299-303.
- Li QX, Fuller SJ, Beyreuther K, Masters CL. The amyloid precursor protein of Alzheimer disease in human brain and blood. *J Leukoc Biol*. 1999 Oct; 66(4):567-74.
- Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, Lee JH, Ciarallo S, Catzavelos C, Beniston R, Franssen E, Slingerland JM. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1arrest. *Nat Med*. 2002 Oct; 8(10):1153-60.
- Lim GP, Chu T, Yang F, Beech W, Frautschy SA, Cole GM. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J Neurosci*. 2001 Nov 1; 21(21):8370-7.
- Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991. 66: 807-815.
- Lorenzo A, Yuan M, Zhang Z, Paganetti PA, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Mautino J, Vigo FS, Sommer B, Yankner BA. Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*. 2000 May; 3(5):460-4.
- Lovasic L, Bauschke H, Janus C. Working memory impairment in a transgenic amyloid precursor protein TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav*. 2005 Apr;4(3):197-208.
- Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Moran MA, Hen R, Avila J. Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J*. 2001 Jan 15; 20(1-2):27-39.
- Luna-Medina R, Cortes-Canteli M, Alonso M, Santos A, Martinez A, Perez-Castillo A. Regulation of inflammatory response in neural cells in vitro by

thiadiazolidinones derivatives through peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. *J Biol Chem*. 2005 Jun 3; 280(22):21453-62.

- Luterman JD, Haroutunian V, Yemul S, Ho L, Purohit D, Aisen PS, Mohs R, Pasinetti GM. Cytokine gene expression as a function of the clinical progression of Alzheimer disease dementia. *Arch Neurol*. 2000 Aug; 57(8):1153-60.
- Maes OC, Xu S, Yu B, Chertkow HM, Wang E, Schipper HM. Transcriptional profiling of Alzheimer blood mononuclear cells by microarray. *Neurobiol Aging*. 2006 Sep 15; [Epub ahead of print].
- Maier M, Seabrook TJ, Lazo ND, Jiang L, Das P, Janus C, Lemere CA. Short amyloid-beta (A β) immunogens reduce cerebral A β load and learning deficits in an Alzheimer's disease mouse model in the absence of an A β -specific cellular immune response. *J Neurosci*. 2006 May 3; 26(18):4717-28.
- Majors A, Ehrhart LA, Pezacka EH. Homocysteine as a risk factor for vascular disease. Enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Oct; 17(10):2074-81.
- Mandelkow EM, Drewes G, Biernat J, Gustke N, Van Lint J, Vandenheede JR, Mandelkow E. Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett*. 1992 Dec 21; 314(3):315-21.
- Mandelkow EM, Thies E, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow E. MARK/PAR1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons. *J Cell Biol*. 2004 Oct 11; 167(1):99-110. Epub 2004 Oct 4.
- Mann DM, Marcyniuk B, Yates PO, Neary D, Snowden JS. The progression of the pathological changes of Alzheimer's disease in frontal and temporal neocortex examined both at biopsy and at autopsy. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1988 May-Jun; 14(3):177-95.
- Mann H, McCoy MT, Subramaniam J, Van Remmen H, Cadet JL. Overexpression of superoxide dismutase and catalase in immortalized neural cells: toxic effects of hydrogen peroxide. *Brain Res*. 1997 Oct; 770(1-2):163-8.
- Marino S, Krimpenfort P, Leung C, van der Korput HA, Trapman J, Camenisch I, Berns A, Brandner S. PTEN is essential for cell migration but not for fate determination and tumourigenesis in the cerebellum. *Development* 2002; 129:3513-3522.
- Masliah E, Mallory M, Alford M, Hansen LA, Saitoh T. Immunoreactivity of the nuclear antigen p105 is associated with plaques and tangles in Alzheimer's disease. *Lab Invest*. 1993 Nov; 69(5):562-9.
- Massague J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*. 2004. Nov 18; 432(7015):298-306.

- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Jun; 82(12):4245-9.
- Matsuda S, Yasukawa T, Homma Y, Ito Y, Niikura T, Hiraki T, Hirai S, Ohno S, Kita Y, Kawasumi M, Kouyama K, Yamamoto T, Kyriakis JM, Nishimoto I. c-Jun N-terminal kinase (JNK)-interacting protein-1b/islet-brain-1 scaffolds Alzheimer's amyloid precursor protein with JNKJ. *Neurosci*. 2001 Sep 1;21(17):6597-607.
- Matsuoka Y, Picciano M, La Francois J, Duff K. Fibrillar beta-amyloid evokes oxidative damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2001; 104(3):609-13.
- Mattson MP, Chan SL, Camandola S. Presenilin mutations and calcium signaling defects in the nervous and immune systems. *Bioessays*. 2001 Aug; 23(8):733-44. Review.
- Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE. beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci*. 1992 Feb;12(2):376-89.
- Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000 Nov; 1(2):120-9. Review.
- Mattson MP. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev*. 1997 Oct; 77(4):1081-132. Review.
- Mattson MP. Oxidative stress, perturbed calcium homeostasis, and immune dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neurovirol*. 2002 Dec; 8(6):539-50. Review.
- Mazzola JL, Sirover MA. Subcellular alteration of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in Alzheimer's disease fibroblasts. *J Neurosci. Res* 2003; 71:279-85.
- McGeer PL, McGeer EG. Anti-inflammatory drugs in the fight against Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1996 Jan 17; 777:213-20. Review.
- McGeer PL, McGeer EG. Glial cell reactions in neurodegenerative diseases: pathophysiology and therapeutic interventions. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 1998;12 Suppl 2:S1-6. Review
- McGeer PL, McGeer EG. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev*. 1995 Sep; 21(2):195-218. Review.
- McGeer PL, Rogers J. Anti-inflammatory agents as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Neurology*. 1992 Feb; 42(2):447-9.

- McKeith IG, Galasko D, Kosaka K, Perry EK, Dickson DW, Hansen LA, Salmon DP, Lowe J, Mirra SS, Byrne EJ, Lennox G, Quinn NP, Edwardson JA, Ince PG, Bergeron C, Burns A, Miller BL, Lovestone S, Collerton D, Jansen EN, Ballard C, de Vos RA, Wilcock GK, Jellinger KA, Perry RH. Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium on DLB international workshop *Neurology*. 1996 Nov;47(5):1113-24.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1984 Jul; 34(7):939-44.
- McLaurin J, Cecal R, Kierstead ME, Tian X, Phinney AL, Manea M, French JE, Lambermon MH, Darabie AA, Brown ME, Janus C, Chishti MA, Horne P, Westaway D, Fraser PE, Mount HT, Przybylski M, St George-Hyslop P Therapeutically effective antibodies against amyloid-beta peptide target amyloid-beta residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis. *Nat Med*. 2002 Nov; 8(11):1263-9.
- McPhie DL, Coopersmith R, Hines-Peralta A, Chen Y, Ivins KJ, Manly SP, Kozlowski MR, Neve KA, Neve RL. DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial Alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3. *J Neurosci*. 2003 Jul 30;23(17):6914-27
- McShea A, Harris PL, Webster KR, Wahl AF, Smith MA. Abnormal expression of the cell cycle regulators P16 and CDK4 in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 1997 Jun; 150(6):1933-9.
- McShea A, Lee HG, Petersen RB, Casadesus G, Vincent I, Linford NJ, Funk JO, Shapiro RA, Smith MA. Neuronal cell cycle re-entry mediates Alzheimer disease-type changes. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Oct 3; [Epub ahead of print].
- Mecocci P, Polidori MC, Cherubini A, Ingegneri T, Mattioli P, Catani M, Rinaldi P, Cecchetti R, Stahl W, Senin U, Beal MF. Lymphocyte oxidative DNA damage and plasma antioxidants in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2002 May; 59(5):794-8.
- Mecocci P, Polidori MC, Ingegneri T, Cherubini A, Chionne F, Cecchetti R, Senin U. Oxidative damage to DNA in lymphocytes from AD patients. *Neurology* 1998; 51(4):1014-7.
- Meikrantz W, Schlegel R. Apoptosis and the cell cycle. *J Cell Biochem*. 1995 Jun; 58(2):160-74.
- Merrill GF. Cell synchronization. *Methods Cell Biol*. 1998; 57:229-49. Review.
- Millard SS, Yan JS, Nguyen H, Pagano M, Kiyokawa H, Koff A. Enhanced ribosomal association of p27(Kip1) mRNA is a mechanism contributing to accumulation during growth arrest. *J Biol Chem*. 1997 Mar 14; 272(11):7093-8.

- Miller AL. The methionine-homocysteine cycle and its effects on cognitive diseases. *Altern Med Rev*. 2003 Feb;8(1):7-19. Review.
- Mitnacht S. Control of pRB phosphorylation. *Curr Opin Genet Dev*. 1998. (1):21-7. Review.
- Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reverse D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CV, Checler F, Godaux E, Cordell B, Van Leuven F. Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J Biol Chem*. 1999 Mar 5; 274(10):6483-92.
- Monsonogo A, Weiner HL. Immunotherapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Science*. 2003 Oct 31;302(5646):834-8
- Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature*. 2000 Dec 21-28; 408(6815):982-5.
- Morgan D, Gordon MN, Tan J, Wilcock D, Rojiani AM. Dynamic complexity of the microglial activation response in transgenic models of amyloid deposition: implications for Alzheimer therapeutics. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005 Sep; 64(9):743-53.
- Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*. 2000 May 26; 101(5):451-4. Review.
- Morris JC, Storandt M, McKeel DW Jr, Rubin EH, Price JL, Grant EA, Berg L. Cerebral amyloid deposition and diffuse plaques in "normal" aging: Evidence for presymptomatic and very mild Alzheimer's disease. *Neurology*. 1996 Mar; 46(3):707-19.
- Motomura W, Takahashi N, Nagamine M, Sawamukai M, Tanno S, Kohgo Y, Okumura T. Growth arrest by troglitazone is mediated by p27Kip1 accumulation, which results from dual inhibition of proteasome activity and Skp2 expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2004 Jan 1;108(1):41-6
- Motti ML, De Marco C, Califano D, Fusco A, Viglietto G. Akt-dependent T198 phosphorylation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in breast cancer. *Cell Cycle*. 2004 Aug; 3(8):1074-80.
- Motti ML, Califano D, Troncone G, De Marco C, Migliaccio I, Palmieri E, Pezzullo L, Palombini L, Fusco A, Viglietto G. Complex regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in thyroid cancer cells by the PI3K/AKT pathway: regulation of p27kip1 expression and localization. *Am J Pathol*. 2005 Mar; 166(3):737-49.

- Mullally JE, Moos PJ, Edes K, Fitzpatrick FA. Cyclopentenone prostaglandins of the J series inhibit the ubiquitin isopeptidase activity of the proteasome pathway. *J Biol Chem.* 2001;276(32):30366-30373
- Muñoz U, de Las Cuevas N, Bartolome F, Hermida OG, Bermejo F, Martin-Requero A. The cyclopentenone 15-deoxy-delta (12,14)-prostaglandin J2 inhibits G1/S transition and retinoblastoma protein phosphorylation in immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease patients. *Exp Neurol.* 2005. 195(2):508-17.
- Nacusi LP, Sheaff RJ. Akt1 sequentially phosphorylates p27kip1 within a conserved but non-canonical region. *Cell Div.* 2006 Jun;1:11
- Naderi J, Lopez C, Pandey S. Chronically increased oxidative stress in fibroblasts from Alzheimer's disease patients causes early senescence and renders resistance to apoptosis by oxidative stress. *Mech Ageing Dev.* 2006 Jan; 127(1):25-35.
- Nagy Z, Esiri MM, Cato AM, Smith AD. Cell cycle markers in the hippocampus in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl).* 1997a Jul; 94(1):6-15.
- Nagy Z, Esiri MM, Smith AD. Expression of cell division markers in the hippocampus in Alzheimer's disease and other neurodegenerative conditions. *Acta Neuropathol (Berl).* 1997b Mar; 93(3):294-300.
- Nagy Z. Cell cycle regulatory failure in neurones: causes and consequences. *Neurobiol Aging.* 2000 Nov-Dec; 21(6):761-9. Review.
- Nagy Z. The dysregulation of the cell cycle and the diagnosis of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Nov 7; [Epub ahead of prin].
- Nagy ZS, Combrinck M, Budge M, McShane R. Cell cycle kinesis in lymphocytes in the diagnosis of Alzheimers disease. *Neurosci Lett* 2002; 317 (2): 81-4
- Nagy ZS, Esiri MM, Smith AD. The cell division cycle and the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 1998; 87(4):731-9.
- Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N, Horii I, Loh DY, Nakayama K. Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell.* 1996 May; 85(5):707-20.
- Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Matsumoto M, Nakamichi I, Kitagawa K, Shirane M, Tsunematsu R, Tsukiyama T, Ishida N, Kitagawa M, Nakayama K, Hatakeyama S Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *EMBO J.* 2000 May 2;19(9):2069-81
- Narumiya S, Ohno K, Fukushima M, Fujiwara M. Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. III. Distribution and binding of prostaglandin A2 and delta 12-prostaglandin J2 in nuclei. *J Pharmacol Exp Ther.* 1987 Jul; 242(1):306-11.

- Naujokat C, Hoffmann S. Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab Invest.* 2002 Aug; 82(8):965-80.
- Nicoll JA, Mrak RE, Graham DI, Stewart J, Wilcock G, MacGowan S, Esiri MM, Murray LS, Dewar D, Love S, Moss T, Griffin WS. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2000 Mar; 47(3):365-8.
- Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med.* 2003 Apr; 9(4):448-52.
- Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med.* 2003 Apr; 9(4):448-52.
- Nijhuis EW, Oostervink F, Hinloopen B, Rozing J, Nagelkerken L. Differences in dexamethasone-sensitivity between lymphocytes from patients with Alzheimer's disease and patients with multi-infarct dementia. *Brain Behav Immun.* 1996 Jun; 10(2):115-25.
- Nishimoto I, Okamoto T, Matsuura Y, Takahashi S, Okamoto T, Murayama Y, Ogata E. Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature.* 1993 Mar 4; 362(6415):75-9.
- Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001 Aug; 60(8):759-67.
- Ogawa O, Lee HG, Zhu X, Raina A, Harris PL, Castellani RJ, Perry G, Smith MA. Increased p27, an essential component of cell cycle control, in Alzheimer's disease. *Aging Cell.* 2003 Apr; 2(2):105-10.
- Ohno M. Genetic and pharmacological basis for therapeutic inhibition of beta- and gamma-secretases in mouse models of Alzheimer's memory deficits. *Rev Neurosci.* 2006; 17(4):429-54.
- Okada S, O'Brien JS. Tay-Sachs disease: generalized absence of a beta-D-N-acetylhexosaminidase component. *Science.* 1969 Aug; 165(894):698-700.
- Okuizumi K, Onodera O, Namba Y, Ikeda K, Yamamoto T, Seki K, Ueki A, Nanko S, Tanaka H, Takahashi H, et al. Genetic association of the very low density lipoprotein (VLDL) receptor gene with sporadic Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 1995 Oct; 11(2):207-9.
- Oliva JL, Perez-Sala D, Castrillo A, Martinez N, Canada FJ, Bosca L, Rojas JM. The cyclopentenone 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 binds to and activates H-Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(8):4772-4777.

- Osuga H, Osuga S, Wang F, Fetni R, Hogan MJ, Slack RS, Hakim AM, Ikeda JE, Park DS. Cyclin-dependent kinases as a therapeutic target for stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Aug 29;97(18):10254-9.
- Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science*. 1995. 269(5224):682-5.
- Palotas A, Kalman J, Laskay G, Juhasz A, Janka Z, Penke B. Comparative studies on [Ca²⁺]_i-level of fibroblasts from Alzheimer patients and control individuals. *Neurochem Res*. 2001 Jul;26(7):817-20
- Palotas A, Kalman J, Palotas M, Juhasz A, Janka Z, Penke B. Fibroblasts and lymphocytes from Alzheimer patients are resistant to beta-amyloid-induced increase in the intracellular calcium concentration. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2002 Jun; 26(5):971-4.
- Panegyres PK. The functions of the amyloid precursor protein gene. *Rev Neurosci*. 2001; 12(1):1-39.
- Parker J. Prostaglandin A2 protein interactions and inhibition of cellular proliferation. *Prostaglandins*. 1995 Nov-Dec; 50(5-6):359-75.
- Pasinetti GM From epidemiology to therapeutic trials with anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease: the role of NSAIDs and cyclooxygenase in beta-amyloidosis and clinical dementia. *J Alzheimers Dis*. 2002 Oct;4(5):435-445
- Patton EE, Willems AR Tyers M Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis *Trends Genet*. 1998 Jun;14(6):236-43
- Patton RL, Kalback WM, Esh CL, Kokjohn TA, Van Vickle GD, Luehrs DC, Kuo YM, Lopez J, Brune D, Ferrer I, Masliah E, Newel AJ, Beach TG, Castano EM, Roher AE. Amyloid-beta peptide remnants in AN-1792-immunized Alzheimer's disease patients: a biochemical analysis. *Am J Pathol*. 2006 Sep; 169(3):1048-63.
- Paudel HK, Lew J, Ali Z, Wang JH. Brain proline-directed protein kinase phosphorylates tau on sites that are abnormally phosphorylated in tau associated with Alzheimer's paired helical filaments. *J Biol Chem*. 1993 Nov 5; 268(31):23512-8.
- Paumi CM, Wright M, Townsend AJ, Morrow CS. Multidrug resistance protein (MRP) 1 and MRP3 attenuate cytotoxic and transactivating effects of the cyclopentenone prostaglandin, 15-deoxy-Delta(12,14)prostaglandin J2 in MCF7 breast cancer cells *Biochemistry*. 2003;42(18):5429-37
- Paykel ES, Brayne C, Huppert FA, Gill C, Barkley C, Gehlhaar E, Beardsall L, Girling DM, Pollitt P, O'Connor D. Incidence of dementia in a population older than 75 years in the United Kingdom. *Arch Gen Psychiatry*. 1994 Apr;51(4):325-32.

- Percy ME, Andrews DE, Potter H. Peripheral markers of disease Alzheimer's. In: Scinto LFM, Daffner KR, editors. *Directions from the Alzheimer pathogenic pathway*. Totowa, NJ, USA: Human Press; 2000; 191–268.
- Pérez-García MJ, Cena V, de Pablo Y, Llovera M, Comella JX, Soler RM. Glial cell line-derived neurotrophic factor increases intracellular calcium concentration. Role of calcium/calmodulin in the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem*. 2004 Feb 13; 279(7):6132-42.
- Pérez-Juste G, Aranda A. The cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) is involved in thyroid hormone-mediated neuronal differentiation. *J Biol Chem*. 1999 Feb 19; 274(8):5026-31.
- Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC Jr, Yamaoka LH, Hung WY, Alberts MJ, Walker AP, Bartlett RJ, Haynes CA, Welsh KA, et al. Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet*. 1991 Jun; 48(6):1034-50.
- Perry G, Cash AD, Smith MA. Alzheimer Disease and Oxidative Stress. *J Biomed Biotechnol*. 2002; 2(3):120-123.
- Peterson C, Goldman JE. Alterations in calcium content and biochemical processes in cultured skin fibroblasts from aged and Alzheimer donors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Apr; 83(8):2758-62.
- Petrova TV, Akama KT, Van Eldik LJ. Cyclopentenone prostaglandins suppress activation of microglia: down-regulation of inducible nitric-oxide synthase by 15-deoxy-Delta^{12,14}-prostaglandin J₂. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(8):4668-4673
- Piacentini M, Fesus L, Melino G. Multiple cell cycle access to the apoptotic death programme in human neuroblastoma cells. *FEBS Lett*. 1993 Apr 5; 320(2):150-4.
- Pietrini P, Alexander GE, Furey ML, Dani A, Mentis MJ, Horwitz B, Guazzelli M, Shapiro MB, Rapoport SI. Cerebral metabolic response to passive audiovisual stimulation in patients with Alzheimer's disease and healthy volunteers assessed by PET. *J Nucl Med*. 2000 Apr; 41(4):575-83.
- Pike CJ. Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta-amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 1999 Apr; 72(4):1552-63.
- Podlisny MB, Ostaszewski BL, Squazzo SL, Koo EH, Rydell RE, Teplow DB, Selkoe DJ. Aggregation of secreted amyloid beta-protein into sodium dodecyl sulfate-stable oligomers in cell culture. *J Biol Chem*. 1995 Apr 21; 270(16):9564-70.
- Poduslo JF, Curran GL, Sanyal B, Selkoe DJ. Receptor-mediated transport of human amyloid beta-protein 1-40 and 1-42 at the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*. 1999 Jun; 6(3):190-9.

- Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, Alexander GM, Gatti LA, Firpo EJ, Daling JR, Roberts JM. Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat Med.* 1997 Feb; 3(2):222-5.
- Probst A, Gotz J, Wiederhold KH, Tolnay M, Mistl C, Jaton AL, Hong M, Ishihara T, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Crowther RA, Spillantini MG, Burki K, Goedert M. Axonopathy and amyotrophy in mice transgenic for human four-repeat tau protein. *Acta Neuropathol (Berl).* 2000 May; 99(5):469-81.
- Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, Rosner MR, Safavi A, Hersh LB, Selkoe DJ. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem.* 1998 Dec 4; 273(49):32730-8.
- Quon D, Wang Y, Catalano R, Scardina JM, Murakami K, Cordell B. Formation of beta-amyloid protein deposits in brains of transgenic mice. *Nature.* 1991 Jul 18; 352(6332):239-41.
- Raina AK, Hochman A, Zhu X, Rottkamp CA, Nunomura A, Siedlak SL, Bux H, Castellani RJ, Perry G, Smith MA. Abortive apoptosis in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl).* 2001 Apr; 101(4):305-10.
- Raina AK, Zhu X, Monteiro M, Takeda A, Smith MA. Abortive oncogeny and cell cycle-mediated events in Alzheimer disease. *Prog Cell Cycle Res.* 2000;4:235-42. Review.
- Raina AK, Zhu X, Shimohama S, Perry G, Smith MA. Tipping the apoptotic balance in Alzheimer's disease: the abortosis concept. *Cell Biochem Biophys.* 2003; 39(3):249-55. Review.
- Ranganathan S, Bowser R. Alterations in G(1) to S phase cell-cycle regulators during amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol.* 2003 Mar; 162(3):823-35.
- Rasmussen CD, Means AR. Calmodulin is required for cell-cycle progression during G₁ and mitosis. *EMBO J.* 1989 Jan; 8(1):73-82.
- Ribe EM, Perez M, Puig B, Gich I, Lim F, Cuadrado M, Sesma T, Catena S, Sanchez B, Nieto M, Gomez-Ramos P, Moran MA, Cabodevilla F, Samaranch L, Ortiz L, Perez A, Ferrer I, Avila J, Gomez-Isla T. Accelerated amyloid deposition, neurofibrillary degeneration and neuronal loss in double mutant APP/tau transgenic mice. *Neurobiol Dis.* 2005 Dec; 20(3):814-22. Epub 2005 Aug 24.
- Richard F, Amouyel P. Genetic susceptibility factors for Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.* 2001 Jan 19; 412(1):1-12. Review.
- Richard F, Berr C, Amant C, Helbecque N, Amouyel P, Alperovitch A. Effect of the angiotensin I-converting enzyme I/D polymorphism on cognitive decline. The EVA Study Group. *Neurobiol Aging.* 2000 Jan-Feb; 21(1):75-80.

- Rickle A, Bogdanovic N, Volkman I, Winblad B, Ravid R, Cowburn RF. Akt activity in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Neuroreport* 2004. 15: 955-959
- Ricote, M., Li, A.C., Wilson, T.M., Kelly, C.J. and Glass, C.K. The peroxisome proliferators-activated receptor γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998. 391,79-82.
- Riemenschneider M, Konta L, Friedrich P, Schwarz S, Taddei K, Neff F, Padovani A, Kolsch H, Laws SM, Klopp N, Bickeboller H, Wagenpfeil S, Mueller JC, Rosenberger A, Diehl-Schmid J, Archetti S, Lautenschlager N, Borroni B, Muller U, Illig T, Heun R, Egensperger R, Schlegel J, Forstl H, Martins RN, Kurz A. A functional polymorphism within plasminogen activator urokinase (PLAU) is associated with Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 2006 Aug 15;15(16):2446-56.
- Rivard N, L'Allemain G, Bartek J, Pouyssegur J. Abrogation of p27Kip1 by cDNA antisense suppresses quiescence (G0 state) in fibroblasts. *J Biol Chem.* 1996 Aug; 271(31):18337-41.
- Robles A, Del Ser T, Alom J, Pena-Casanova J; Grupo Asesor del Grupo de Neurología de la Conducta y Demencias de la Sociedad Española de Neurología. [Proposal of criteria for clinical diagnosis of mild cognitive impairment, dementia and Alzheimer's disease] *Neurología.* 2002 Jan; 17(1):17-32. Review.
- Rockenstein E, Mallory M, Mante M, Sisk A, Masliah E. Early formation of mature amyloid-beta protein deposits in a mutant APP transgenic model depends on levels of A β (1-42). *J Neurosci Res.* 2001 Nov 15; 66(4):573-82.
- Rodier G, Montagnoli A, Di Marcotullio L, Coulombe P, Draetta GF, Pagano M, Meloche S. p27 cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation on Ser10 and is not a prerequisite for its proteolysis. *EMBO J.* 2001 Dec; 20(23):6672-82.
- Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature.* 1995 Aug 31; 376(6543):775-8.
- Rogers JT, Leiter LM, McPhee J, Cahill CM, Zhan SS, Potter H, Nilsson LN. Translation of the Alzheimer amyloid precursor protein mRNA is up-regulated by interleukin-1 through 5'-untranslated region sequences. *J Biol Chem.* 1999 Mar 5; 274(10):6421-31
- Ross ME. Cell division and the nervous system: regulating the cycle from neural differentiation to death. *Trends Neurosci.* 1996 Feb; 19(2):62-8. Review.
- Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, Santoro MG. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature.* 2000 Jan 6; 403(6765):103-8.

- Roth KA. Caspases, apoptosis, and Alzheimer disease: causation, correlation, and confusion. : J Neuropathol Exp Neurol. 2001 Sep; 60(9):829-38.
- Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerriere A, Vital A, Dumanchin C, Feuillet S, Brice A, Vercelletto M, Dubas F, Frebourg T, Campion D. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. Nat Genet. 2006 Jan; 38(1):24-6. Epub 2005 Dec 20.
- Rovin BH, Wilmer WA, Lu L, Doseff AI, Dixon C, Kotur M, Hilbelink T. 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 regulates mesangial cell proliferation and death Kidney Int. 2002 Apr; 61(4):1293-1302.
- Saltiel, A.R., Olefsky, J.M. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. Diabetes 1996. 45 (12): 1661–1679.
- Sanchez-Gomez FJ, Cernuda-Morollon E, Stamatakis K, Perez-Sala D. Protein thiol modification by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 addition in mesangial cells: role in the inhibition of pro-inflammatory genes Mol Pharmacol. 2004 Nov; 66(5):1349-58.
- Sayre LM, Smith MA, Perry G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. Curr Med Chem. 2001 Jun; 8(7):721-38. Review.
- Scheffner M, Nuber U, Huibregtse JM. Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. Nature. 373(6509):81-3.
- Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. Nat Med. 1996 Aug; 2(8):864-70.
- Schmalzigaug R, Ye Q, Berchtold MW. Calmodulin protects cells from death under normal growth conditions and mitogenic starvation but plays a mediating role in cell death upon B-cell receptor stimulation. Immunology. 2001 Jul; 103(3):332-42.
- Scorer CA. Preclinical and clinical challenges in the development of disease-modifying therapies for Alzheimer's disease. Drug Discov Today. 2001 Dec 1; 6(23):1207-1219.
- Scott CW, Vulliet PR, Caputo CB. Phosphorylation of tau by proline-directed protein kinase (p34cdc2/p58cyclin A) decreases tau-induced microtubule assembly and antibody SMI33 reactivity. Brain Res. 1993 May 21; 611(2):237-42.
- Sekimoto T, Fukumoto M, Yoneda Y. 14-3-3 suppresses the nuclear localization of threonine157-phosphorylated p27(Kip1). EMBO J. 2004 May; 23(9):1934-42.

- Selkoe DJ, Podlisny MB, Joachim CL, Vickers EA, Lee G, Fritz LC, Oltersdorf T. Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988 Oct; 85(19):7341-5.
- Selkoe DJ. Aging, amyloid, and Alzheimer's disease: a perspective in honor of Carl Cotman. *Neurochem Res*. 2003 Nov; 28(11):1705-13. Review.
- Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*. 2001a Apr;81(2):741-66. Review.
- Selkoe DJ. Deciphering the genesis and fate of amyloid beta-protein yields novel therapies for Alzheimer disease. *J Clin Invest*. 2002 Nov;110(10):1375-81. Review.
- Selkoe DJ. Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001b Sep 25; 98(20):11039-41. Review.
- Selznick LA, Holtzman DM, Han BH, Gokden M, Srinivasan AN, Johnson EM Jr, Roth KA. In situ immunodetection of neuronal caspase-3 activation in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999 Sep; 58(9):1020-6.
- Sheaff RJ, Groudine M, Gordon M, Roberts JM, Clurman BE. Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev*. 1997 Jun 1; 11(11):1464-78.
- Shelton SB, Krishnamurthy P, Johnson GV. Effects of cyclin-dependent kinase-5 activity on apoptosis and tau phosphorylation in immortalized mouse brain cortical cells. *J Neurosci Res*. 2004 Apr 1; 76(1):110-20.
- Shen X, Valencia CA, Szostak JW, Dong B, Liu R. Scanning the human proteome for calmodulin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Apr; 102(17):5969-74.
- Sherr CJ, Kato J, Quelle DE, Matsuoka M, Roussel MF. D-type cyclins and their cyclin-dependent kinases: G1 phase integrators of the mitogenic response. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1994; 59:11-9.
- Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*. 1995 May 15; 9(10):1149-63. Review.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1995 Jun 29; 375(6534):754-60.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1995 Jun 29; 375(6534):754-60.

- Shibata T, Yamada T, Kondo M, Tanahashi N, Tanaka K, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J, Uchida K. An endogenous electrophile that modulates the regulatory mechanism of protein turnover: inhibitory effects of 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 on proteasoma. *Biochemistry* 2003; Dec 2; 42(47):13960-13968.
- Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, Arteaga CL. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* 2002; 8: 1145-1152.
- Shumaker SA, Legault C, Rapp SR, Thal L, Wallace RB, Ockene JK, Hendrix SL, Jones BN 3rd, Assaf AR, Jackson RD, Kotchen JM, Wassertheil-Smoller S, Wactawski-Wende J; WHIMS Investigators. Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2003 May 28;289(20):2651-62.
- Sims NR, Finegan JM, Blass JP. Altered metabolic properties of cultured skin fibroblasts in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1987 May; 21(5):451-7.
- Smale G, Nichols NR, Brady DR, Finch CE, Horton WE Jr. Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 1995 Jun; 133(2):225-30.
- Smith TW, Lippa CF. Ki-67 immunoreactivity in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1995 May;54(3):297-303
- Song, G., Ouyang, G. y Bao, S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*. 2005; 9: 59-71.
- Stadelmann C, Deckwerth TL, Srinivasan A, Bancher C, Bruck W, Jellinger K, Lassmann H. Activation of caspase-3 in single neurons and autophagic granules of granulovacuolar degeneration in Alzheimer's disease. Evidence for apoptotic cell death. *Am J Pathol*. 1999 Nov; 155(5):1459-66.
- Stamatakis K, Sanchez-Gomez FJ, Perez-Sala D. Identification of novel protein targets for modification by 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2 in mesangial cells reveals multiple interactions with the cytoskeleton. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Jan;17(1):89-98
- Stein TD, Johnson JA. Lack of neurodegeneration in transgenic mice overexpressing mutant amyloid precursor protein is associated with increased levels of transthyretin and the activation of cell survival pathways. *J Neurosci* 2002. 22: 7380-7388.
- Stern Y. Cognitive reserve and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2006 Jul-Sep; 20(3 Suppl 2):S69-74.
- Stewart, W.F., Kawas, C., Corrada, M. and Metler, E.J. Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. *Neurology* 1997. 48, 626-632.

- Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB, Painter GF, Holmes AB, McCormick F, Hawkins PT. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science*. 1997. 277(5325):567-70.
- Storey E, Spurck T, Pickett-Heaps J, Beyreuther K, Masters CL. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is found on the surface of static but not activity motile portions of neuritis. *Brain Res*. 1996 Sep 30; 735(1):59-66.
- Styren SD, Mufson EJ, Styren GC, Civin WH, Rogers J. Epidermal growth factor receptor expression in demented and aged human brain. *Brain Res*. 1990 Apr 2; 512(2):347-52.
- Su JH, Anderson AJ, Cummings BJ, Cotman CW. Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 1994 Dec 20; 5(18):2529-33
- Subbaramaiah K, Bulic P, Lin Y, Dannenberg AJ, Pasco DS. Development and use of a gene promoter-based screen to identify novel inhibitors of cyclooxygenase-2 transcription. *J Biomol Screen* 2001; 6(2):101-10.
- Sun YX, Wright HT, Janciauskiene S. Alpha1-antichymotrypsin/Alzheimer's peptide Abeta(1-42) complex perturbs lipid metabolism and activates transcription factors PPARgamma and NFkappaB in human neuroblastoma (Kelly) cells. *J Neurosci Res*. 2002 Feb 15; 67(4):511-22.
- Suzuki T, Oishi M, Marshak DR, Czernik AJ, Nairn AC, Greengard P. Cell cycle-dependent regulation of the phosphorylation and metabolism of the Alzheimer amyloid precursor protein. *EMBO J*. 1994b Mar 1; 13(5):1114-22.
- Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Iino N, Takeshita A. 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 and thiazolidinediones activate the MEK/ERK pathway through phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2001;276(52):48950-48955
- Tan J, Town T, Suo Z, Wu Y, Song S, Kundtz A, Kroeger J, Humphrey J, Crawford F, Mullan M. Induction of CD40 on human endothelial cells by Alzheimer's beta-amyloid peptides. *Brain Res Bull*. 1999 Sep 15; 50(2):143-8.
- Tang BN, Minoshima S, George J, Robert A, Swine C, Laloux P, Borghet TV. Diagnosis of suspected Alzheimer's disease is improved by automated analysis of regional cerebral blood flow. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004 Nov; 31(11):1487-94.
- Tanzi RE. Molecular genetics of Alzheimer's disease and the amyloid beta peptide precursor gene. *Ann Med*. 1989; 21(2):91-4. Review.
- Taru H, Iijima K, Hase M, Kirino Y, Yagi Y, Suzuki T. Interaction of Alzheimer's beta -amyloid precursor family proteins with scaffold proteins of the JNK signaling cascade. *J Biol Chem*. 2002 May 31; 277(22):20070-8.

- Tatebayashi Y, Takeda M, Kashiwagi Y, Okochi M, Kurumadani T, Sekiyama A, Kanayama G, Hariguchi S, Nishimura T. Cell-cycle-dependent abnormal calcium response in fibroblasts from patients with familial Alzheimer's disease. *Dementia*. 1995 Jan-Feb; 6(1):9-16.
- Terry RD. Senile dementia. *Fed Proc*. 1978 Dec; 37(14):2837-40.
- Terry RD. The fine structure of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *J neuropathol exp neurol*. 1963 Oct; 22:629-42.
- Tokumitsu H, Chijiwa T, Hagiwara M, Mizutani A, Terasawa M, Hidaka H. KN-62, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine, a specific inhibitor of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 1990. 265:4315-4320.
- Toutenhoofd SL, Strehler EE. The calmodulin multigene family as a unique case of genetic redundancy: multiple levels of regulation to provide spatial and temporal control of calmodulin pools? *Cell Calcium*. 2000 Aug; 28(2):83-96. Review
- Troncoso JC, Sukhov RR, Kawas CH, Koliatsos VE. In situ labeling of dying cortical neurons in normal aging and in Alzheimer's disease: correlations with senile plaques and disease progression. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996 Nov; 55(11):1134-42.
- Troy CM, Stefanis L, Greene LA, Shelanski ML. Mechanisms of neuronal degeneration: a final common pathway? *Adv Neurol*. 1997; 72:103-11.
- Tyagi SC. Homocysteine redox receptor and regulation of extracellular matrix components in vascular cells. *Am J Physiol*. 1998 Feb; 274(2 Pt 1):C396-405.
- Uberti D, Carsana T, Bernardi E, Rodella L, Grigolato P, Lanni C, et al. Selective impairment of p53-mediated cell death in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *J Cell Sci* 2002;115:3131-8
- Um SH, Rhee DK, Pyo S. Involvement of protein kinase C and tyrosin kinase in tumoricidal activation of macrophage induced by *Streptococcus pneumoniae* type II capsular polysaccharide. *Int Immunopharmacol*. 2002 Jan; 2(1):129-37.
- Urcelay, E., Ibarreta, D., Parrilla, R., Ayuso, M.S. and Martin-Requero, A. Enhanced proliferation of lymphoblasts from patients with Alzheimer dementia associated with calmodulin-dependent activation of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Neurobiol. Dis.* 2001. 8:289-298.
- Van Dam D, D'Hooge R, Staufenbiel M, Van Ginneken C, Van Meir F, De Deyn PP. Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition. *Eur J Neurosci*. 2003 Jan; 17(2):388-96.

- Varadarajan S, Yatin S, Aksenova M, Butterfield DA. Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J Struct Biol.* 2000 Jun; 130(2-3):184-208. Review.
- Viglietto G, Motti ML, Bruni P, Melillo RM, D'Alessio A, Califano D, Vinci F, Chiappetta G, Tsichlis P, Bellacosa A, Fusco A, Santoro M. Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer *Nat Med.* 2002 Oct; 8(10):1136-44.
- Vincent I, Rosado M, Davies P. Mitotic mechanisms in Alzheimer's disease? *J Cell Biol.* 1996 Feb; 132(3):413-25.
- Vitagliano D, Carlomagno F, Motti ML, Viglietto G, Nikiforov YE, Nikiforova MN, Hershtman JM, Ryan AJ, Fusco A, Melillo RM, Santoro M. Regulation of p27Kip1 protein levels contributes to mitogenic effects of the RET/PTC kinase in thyroid carcinoma cells. *Cancer Res.* 2004 Jun; 64(11):3823-9.
- Vuocolo S, Soprano DR, Soprano KJ. p27/Kip1 mediates retinoic acid-induced suppression of ovarian carcinoma cell growth. *J Cell Physiol.* 2004 May; 199(2):237-43.
- Wade SB, Oommen P, Conner WC, Earnest DJ, Miranda RC. Overlapping and divergent actions of estrogen and the neurotrophins on cell fate and p53-dependent signal transduction in conditionally immortalized cerebral cortical neuroblasts. *J Neurosci.* 1999 Aug 15; 19(16):6994-7006.
- Wakino S, Hayashi K, Kanda T, Tatematsu S, Homma K, Yoshioka K, Takamatsu I, Saruta T. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit Rho/Rho kinase pathway by inducing protein tyrosine phosphatase SHP-2 *Circ Res.* 2004 Sep 3; 95(5):e45-55
- Wang F, Gregory C, Sample C, Rowe M, Liebowitz D, Murray R, Rickinson A, Kieff E. Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J Virol.* 1990 May; 64(5):2309-18.
- Watson GS, Craft S. The role of insulin resistance in the pathogenesis of Alzheimer's disease: implications for treatment. *CNS Drugs.* 2003; 17(1):27-45
- Webber KM, Casadesus G, Atwood CS, Bowen RL, Perry G, Smith MA. Gonadotropins: A cohesive gender-based etiology of Alzheimer disease. *Mol Cell Endocrinol.* 2007 Jan 2; 260-262:271-5.
- Webster SD, Tenner AJ, Poulos TL, Cribbs DH. The mouse C1q A-chain sequence alters beta-amyloid-induced complement activation. *Neurobiol Aging.* 1999 May-Jun; 20(3):297-304.

- Wei W, Norton DD, Wang X, Kusiak JW. Abeta 17–42 in Alzheimer's disease activates JNK and caspase-8 leading to neuronal apoptosis. *Brain* 2002; 125:2036–2043.
- Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995; 81(3):323-330.
- Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, Carlson GA, Younkin SG, Ashe KH. The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2002 Mar 1; 22(5):1858-67.
- White P, Hiley CR, Goodhardt MJ, Carrasco LH, Keet JP, Williams IE, Bowen DM. Neocortical cholinergic neurons in elderly people. *Lancet.* 1977 Mar 26;1(8013):668-71
- Wilcock DM, Munireddy SK, Rosenthal A, Ugen KE, Gordon MN, Morgan D. Microglial activation facilitates Abeta plaque removal following intracranial anti-Abeta antibody administration. *Neurobiol Dis.* 2004 Feb; 15(1):11-20.
- Wischik CM, Novak M, Edwards PC, Klug A, Tichelaar W, Crowther RA. Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Jul; 85(13):4884-8.
- Wu Q, Combs C, Cannady S, Geldmacher D, Herrup K. Beta-amyloid activated microglia induce cell cycling and cell death in cultured cortical neurons. *Neurobiol Aging* 2000; 21(6):797-806.
- Wymann MP, Marone R. Phosphoinositide 3-kinases in disease: timing, location and scaffolding. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2005. 17: 141–149
- Wyss Coray T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, by stander or beneficial response? *Nat. Med.* 2006 Sep; (9): 1005-15. Review.
- Xie L, Helmerhorst E, Taddei K, Plewright B, Van Bronswijk W, Martins R. Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J Neurosci.* 2002 May 15; 22(10):RC221. Epub 2002 May 10.
- Yang Y, Geldmacher DS, Herrup K. DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease. *J. of Neurosci.* 2001; 21(8):2661-8.
- Yang Y, Herrup K. Cell division in the CNS: Protective response or lethal event in post-mitotic neurons? *Biochim Biophys Acta.* 2006 Oct 7; [Epub ahead of print].
- Yang Y, Mufson EJ, Herrup K. Neuronal cell death is preceded by cell cycle events at all stages of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2003 Apr 1; 23(7):2557-63.

- Yang Y, Varvel NH, Lamb BT, Herrup K. Ectopic cell cycle events link human Alzheimer's disease and amyloid precursor protein transgenic mouse models. *J Neurosci*. 2006 Jan 18; 26(3):775-84.
- Yano H, Agatsuma T, Nakanishi S, Saitoh Y, Fukui Y, Nonomura Y, Matsuda Y. Biochemical and pharmacological studies with KT7692 and LY294002 on the role of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc epsilon RI-mediated signal transduction. *Biochem J*. 1995. 312. (Pt1):145-50.
- Yano S, Tokumitsu H, Soderling TR. Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway *Nature*. 1998 Dec ;396(6711):584-587.
- Yoshimura Y, Ichinose T, Yamauchi T. Phosphorylation of tau protein to sites found in Alzheimer's disease brain is catalyzed by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II as demonstrated tandem mass spectrometry. *Neurosci Lett*. 2003 Dec 26; 353(3):185-8.
- Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature*. 2000 Oct 12; 407(6805):802-9.
- Zeng HT, Tulsiani DR. Calmodulin antagonists differentially affect capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation of mouse sperm components. *J Cell Sci*. 2003. 116(Pt 10):1981-9.
- Zhang J, Kong Q, Zhang Z, Ge P, Ba D. Telomere dysfunction of lymphocytes in patients with Alzheimer disease. *Cogn Behav Neurol*. 2003 Sep; 16(3):170-6.
- Zhao W, Payne V, Tommasi E, Diz DI, Hsu FC, Robbins ME. Administration of the peroxisomal proliferator-activated receptor gamma agonist pioglitazone during fractionated brain irradiation prevents radiation-induced cognitive impairment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007 Jan 1; 67(1):6-9.
- Zhao WQ, Ravindranath L, Mohamed AS, Zohar O, Chen GH, Lyketsos CG, et al. MAP kinase signaling cascade dysfunction specific to Alzheimer's disease in fibroblasts. *Neurobiol Dis*. 2002; 11:166-83.
- Zhu X, Lee HG, Perry G, Smith MA. Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: An update. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Oct 27; [Epub ahead of print].
- Zhu X, Rottkamp CA, Raina AK, Brewer GJ, Ghanbari HA, Boux H, Smith MA. Neuronal CDK7 in hippocampus is related to aging and Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*. 2000 Nov-Dec; 21(6):807-13.